

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/KR05/000557

International filing date: 28 February 2005 (28.02.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: KR

Number: 10-2004-0013663

Filing date: 27 February 2004 (27.02.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 30 June 2005 (30.06.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office

출 원 번 호 : 특허출원 2004년 제 0013663 호
Application Number 10-2004-0013663

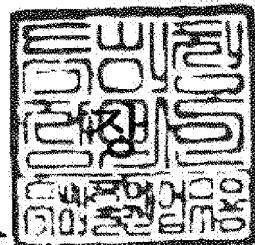
출 원 일 자 : 2004년 02월 27일
Date of Application FEB 27, 2004

출 원 인 : 제노마인(주) 외 1 명
Applicant(s) GENOMINE INC., et al

2005 년 06 월 08 일

특 허 청

COMMISSIONER



【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2004.02.27
【발명의 국문명칭】	피토크롬과 상호 결합 작용하는 신규 단백질 및 이의 용도
【발명의 영문명칭】	Novel phytochrome-interacting protein and a use thereof
【출원인】	
【명칭】	제노마인(주)
【출원인코드】	1-1999-062412-6
【출원인】	
【명칭】	학교법인 포항공과대학교
【출원인코드】	2-1999-900096-8
【대리인】	
【성명】	김석현
【대리인코드】	9-1998-000634-1
【포괄위임등록번호】	1999-069596-3
【포괄위임등록번호】	2000-006762-0
【발명자】	
【성명의 국문표기】	남홍길
【성명의 영문표기】	NAM,Hong Gi I
【주민등록번호】	571220-1906022
【우편번호】	790-390
【주소】	경상북도 포항시 남구 지곡동 교수아파트 A동 702호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	유종상
【성명의 영문표기】	RYU,Jong-Sang

【주민등록번호】 710504-1167711

【우편번호】 461-191

【주소】 경기도 성남시 수정구 태평1동 5345번지

【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 임평옥

【성명의 영문표기】 LIM,Pyung Ok

【주민등록번호】 591222-2162519

【우편번호】 790-390

【주소】 경상북도 포항시 남구 지곡동 교수아파트 4동 902호

【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 구자춘

【성명의 영문표기】 KOO, JA CHOON

【주민등록번호】 660704-1009532

【우편번호】 157-894

【주소】 서울특별시 강서구 화곡 4동 468-11

【국적】 KR

【핵산염기 및 아미노산 서열목록】

【서열개수】 13

【서열목록의 전자문서】 첨부

【취지】 특허법 제42조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다. 대
리인 김석

현 (인)

【수수료】

【기본출원료】 59 면 38,000 원

【가산출원료】 0 면 0 원

【우선권주장료】	0	건	0	원
【심사청구료】	0	항	0	원
【합계】	38,000	원		
【감면사유】	중소기업			
【감면후 수수료】	19,000	원		
【첨부서류】	1. 중소기업기본법시행령 제2조에의한 중소기업에 해당함을 증명하는 서류[사업자등록증, 원천징수이행상황신고서]_1통			

【요약서】

【요약】

본 발명은 피토크롬과 상호 결합하는 신규 단백질 및 이의 용도에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열 또는 상기 아미노산 서열과 적어도 80% 이상의 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 분리된 폴리펩티드 및 이의 용도에 관한 것이다. 본 발명에서 제공하는 폴리펩티드는 피토크롬 A 및 B와 교차 상호 결합하며, 상기 상호 결합에는 그의 N-말단에 존재하는 TPR 도메인이 관여한다. 또한 상기 폴리펩티드의 C-말단에는 탈인산화효소 활성을 담당하는 PP2A 촉매 도메인(PP2Ac)이 존재한다. 본 발명에 따른 폴리펩티드는 탈인산화효소로서 이용될 수 있으며, 광 신호전달에 민감한 식물체의 제조에 유용하게 이용될 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 폴리펩티드 내에 존재하는 TPR 도메인은 왜성 식물체의 제조에 이용될 수 있다.

【대표도】

도 7

【색인어】

제5형 세린/쓰레오닌 단백질 탈인산화효소, 피토크롬, TPR 도메인

【명세서】

【발명의 명칭】

피토크롬과 상호 결합 작용하는 신규 단백질 및 이의 용도{Novel phytochrome-interacting protein and a use thereof}

【도면의 간단한 설명】

<1> **도 1**은 애기장대 cDNA 라이브러리에서 피토크롬 A와 상호 결합 작용하는 단백질을 찾기 위하여 제작한 효모 2-하이브리드 시스템의 베이트(bait)의 간략한 구성도이다.

<2> 구획된 직사각형(partitioned rectangle): 크로모포어(chromophore)

<3> PSD: 광센서 도메인(photosensory domain)

<4> PRD: PAS(Per-Arnt-Sim)-관련 도메인

<5> HKRD: 히스티딘 키나제-관련 도메인

<6> **도 2**는 애기장대 게놈 내 *PAPP5* 유전자와 그로부터 암호화되는 *PAPP5* 단백질의 간략한 구성도이다.

<7> **도 3**은 본 발명의 *PAPP5*와 여러 종으로부터 분리된 제5형 세린/쓰레오닌 단백질 탈인산화효소(PP5s)의 아미노산 서열을 다중 정렬(multiple alignment)한 결과이다.

<8> H. sap PP5: 효모 사피엔스(*Homo sapiens*)의 PP5(GenBank accession No.

CAA61595)

<9> M. mus PP5: 무스 무스쿨루스(*Mus musculus*)의 PP5(GenBank accession No. AAB70573)

<10> R. nor PP5: 라투스 노르베기쿠스(*Rattus norvegicus*)의 PP5(GenBank accession No. CAA54454)

<11> S. cer PP5: 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*)의 PP5(GenBank accession No. CAA58158)

<12> D. meg PP5: 드로소필라 멜라노개스터(*Drosophila melanogaster*)의 PP5(GenBank accession No. CAB99478)

<13> C. ele PP5: 캐노르합디티스 엘레강스(*Caenorhabditis elegans*)의 PP5(GenBank accession No. CAC51076)

<14> **도 4**는 본 발명의 PAPP5와 피토크롬 A와의 상호 결합 작용을 알아보기 위한 효모 2-하이브리드 분석에 사용된 각 베이트 및 프레이(prey)의 구성도 및 이들을 이용하여 효모 2-하이브리드 분석을 수행한 결과이다.

<15> **도 5**는 글루타치온-S-트랜스퍼라아제(GST)와 PAPP5의 융합 단백질(GST-PAPP5)과 피토크롬 A 또는 피토크롬 B 간의 상호 결합을 알아보기 위하여 시험관 내 결합 분석을 수행한 결과이다.

<16> **도 6**은 본 발명에 따른 PAPP5에서 피토크롬과 상호 결합 작용하는 부위를 규명하기 위하여 풀-다운 분석(A) 및 PAPP5의 절편을 이용한 효모 2-하이브리드 상호

결합 정량 분석(B)을 수행한 결과이다.

<17> **도 7**은 본 발명에 따른 PAPP5의 효소 활성을 알아보기 위하여 시험관 내 탈인산화효소 분석을 수행한 결과이다.

<18> A: 아라키돈산 100 μ M 농도 하에서 파라-인산니트로페놀(ρ -nitrophenol phosphate; ρ NPP)를 기질로 하여 분석한 결과

<19> B: 100 mM의 ρ NPP 농도 하에서 아라키돈산(arachidonic acid) 첨가에 의한 촉매효과를 분석한 결과

<20> C: PAPP5 및 이의 도메인 절편들을 대상으로 아라키돈산의 첨가에 따른 효소 활성의 촉매효과를 분석한 결과

<21> **도 8**은 *PAPP5* 유전자가 녹-아웃된 변이체(*papp5-1* 및 *papp5-2*)에서 T-DNA가 삽입된 부분을 나타낸 모식도(A)와 상기 녹아웃 변이체들의 PAPP5의 유전자 발현수준을 야생형(Col-0, Ws-2) 및 PAPP5 과발현 식물체(*PAPP5-OX1* 및 *PAPP5-OX2*)와 비교하여 나타낸 결과(B)이다.

<22> **도 9**는 녹-아웃 변이체(*papp5-1*)와 과발현 식물체(*PAPP5-OX2*)의 광반응성을 야생형(Col-0) 및 피토크롬 변이체(*phyA-211* 및 *phyB-9*)와 비교하여 조사한 결과이다.

<23> Rc-HIR: 적색광 조사

<24> FRc-HIR: 원적색상 조사

<25> **도 10**은 적색광(Red) 또는 원적색광(Far-red) 조사시 녹-아웃 변이체(*papp5-*

I 및 *papp5-2*) 및 과발현 식물체(*PAPP5-OX1* 및 *PAPP5-OX2*)들에서 광반응 유전자들 (*CAB2*, *RBCS* 및 *CHS*)의 발현 수준을 야생형(Col-0 및 Ws-2)과 비교하여 분석한 결과이다.

<26> **도 11**은 자가인산화된 귀리 피토크롬 A(phyA)에 대한 PAPP5의 탈인산화 활성을 측정한 결과를 도시한 것이다.

<27> A: PAPP5와 이들의 도메인 절편들의 탈인산화 활성을 측정한 결과

<28> 25% 글리세롤 및 GST: 대조구

<29> GST-TPR: GST와 PAPP5의 TPR 도메인의 융합 단백질

<30> GST-PP2Ac: GST와 PAPP5의 제2A형 탈인산화효소(PP2A)와 유사성을 갖는 도메인 촉매 도메인의 융합 단백질

<31> GST-PAPP5: GST와 전장 PAPP5의 융합 단백질

<32> B: 귀리 피토크롬 A의 광흡수형태에 따른 PAPP5의 탈인산화 활성을 측정한 결과

<33> **도 12**는 PAPP5의 TPR 도메인을 과발현하는 벡터의 간략한 구성도(A)와 상기 벡터가 도입된 TPR 도메인 과발현 식물체의 T_1 , T_2 및 T_3 세대의 모습(B)이다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<34> 본 발명은 피토크롬 광 신호전달 기작에 관여하는 신규 단백질 및 이의 용도에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 피토크롬과 상호 결합 작용하는 제5형 쎄린/쓰레오닌 단백질 탈인산화효소 및 이의 용도에 관한 것이다.

<35> 식물체들은 그들의 빛 환경의 상태를 감지하기 위하여 다양한 광 수용체를 발달시켜왔다. 광수용체(미확인 UV-B 수용체, UV-A/청색광 스펙트럼부위를 감지하는 크립토크롬과 포토트로핀 및 적색광/원적색광 스펙트럼부위를 감지하는 피토크롬)들은 식물의 생장과 발달을 조절하는 유전자들에게 신호를 매개한다 (Fankhauser, C. & Chory, J. *Curr. Biol.*, 9:R123-R126, 1999; Neff, M. M., et al., *Genes Dev.*, 14:257-271, 2000). 최근 분자 생물학 및 생화학적 연구기술과 분자 유전학적 연구기술의 발전에 힘입어 광수용체 뿐 아니라, 광수용체로부터 광반응 유전자들로의 광신호의 전달에 관여하는 다양한 신호 매개체들에 대한 유전적 규명과 분자적 클로닝이 이루어졌다(Quail, P. H. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 14:180-188, 2002; Gyula, P. et al., *Curr. Opin. Plant Biol.*, 6:446-452, 2003).

<36> 피토크롬은 고등식물의 생장 및 발달의 다양한 면을 조절하는, 그 특성이 가장 잘 연구되어진 광수용체이다. 피토크롬에 조사되는 광의 스펙트럼에 따라 생물학적으로 불활성인 적색광 흡수형 피토크롬(Pr)과 생물학적으로 활성인 원적색광 흡수형 피토크롬(Pfr) 사이에서 상호 호환성의 광-전환(photo-conversion)이 나타난다. 적색광 처리에 의한 Pfr 형태로의 광-전환은 피토크롬 자체의 세포질로부터

핵으로의 이동(translocation)을 개시하고, 유전자 발현과 발달에 다면적 효과를 유도하는 신호 전달 경로(signal transduction pathway)를 활성화시켜 결과적으로 식물체의 생장 및 발달을 조절하게 된다(Quail, P. H. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 14:180-188, 2002; Fankhauser, C. & Chory, J. *Curr. Biol.*, 9:R123-R126, 1999). 애기장대에서는 phyA, phyB, phyC, phyD 및 phyE로 표시되는 5가지의 피토크롬이 있는 것으로 보고되고 있다(Neff, M. M., et al., *Genes Dev.*, 14:257-271, 2000; Quail, P. H. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 14:180-188, 2002).

<37> 전형적인 피토크롬은 크기가 약 116-127 kDa 아포프로테인(apoprotein)과 이에 공유결합으로 연결되는 피토크로모빌린(phytochromobilin)이라는 선형 테트라피를 광흡수체(tetrapyrrole chromophore)로 구성되어 있다(Quail, P. H. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 14:180-188, 2002; Gyula, P. et al., *Curr. Opin. Plant Biol.*, 6:446-452, 2003). 피토크롬의 광감지 활성은 Pr형과 Pfr형 사이에서 가역적인 광-유도 상호전환(reversible light-induced interconversion)을 할 수 있는 그의 독특한 능력에서 기인된다. 피토크롬 분자의 단량체(monomer)는 광흡수체를 고정시키는 구형의 N-말단 도메인(~70kDa), 구조적으로 유연성을 갖는 힌지 부위(hinge region)를 통해 연결된 C-말단 도메인으로 구성되어 있다. 상기 N-말단 도메인이 광을 감지하는 기능을 수행한다. 또한, 구조적으로 열린 C-말단 도메인(~55kDa)은 신호전달(signal transfer)에 관여하는 것으로 알려졌다(Quail, P. H. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 14:180-188, 2002; Gyula, P. et al., *Curr. Opin. Plant Biol.*, 6:446-452, 2003). 상기 C-말단 도메인은 조절 중심 부위

(regulatory core region) 주위에 한 쌍의 Per-Ant-Sim(PAS) 모티프를 가지고 있다. 상기 PAS 모티프는 몇몇 감지 단백질(sensory protein)에서 단백질-단백질 상호작용 및 도메인 내 커뮤니케이션(inter-domain communication)에 관여하는 것으로 알려져 있다. 재조합 귀리 피토크롬 A를 이용한 분석을 통해 피토크롬의 C-말단 도메인이 세린/쓰레오닌 단백질 인산화효소(serine/threonine protein kinase)의 활성을 보유하고 있음이 보고 된 바 있다(Yeh, K. C. & Lagarias, J. C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95:13976-13981, 1998; Fankhauser, C. *et al.*, *Science*, 284:1539-1541, 1999). 또한, 광흡수체에 의해 유도되는 피토크롬의 광-이성질화(photo-isomerization)는 잘 알려진 동물의 시각 수용체인 로돕신 (rhodopsin)(Maeda, T. *et al.*, *Prog. Retin. Eye Res.*, 22:417-434, 2003; Vishnivetskiy, S. A. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 275:41049-41057, 2000)처럼 분자 내에서 도메인간 커뮤니케이션을 통해 전체 피토크롬 분자에 구조적 변화를 유발시키고 있음이 스펙트럼 및 광화학적 실험 결과들을 통해 제시되었다. 또한, 피토크롬의 구조적 변화의 신호는 피토크롬 분자 내 도메인간 상호작용에 의해 더욱 분화되어질 수 있으며, 이는 헌지 부위의 세린 잔기에서 가역적인 인산화/탈인산화 (reversible phosphorylation/dephosphorylation)에 의해 조절되는 것으로 추정되어지고 있다. 그러나, 이러한 많은 신빙성 있는 결과에도 불구하고, 피토크롬이 광-반응 유전자들에게 광 신호를 전달하는 구체적인 기작은 지금까지도 완전하게 밝혀지지 않았다.

<38> 이에 본 발명자들은 피토크롬의 광 신호 전달 기작 및 이에 관여하는 새로운 매개체 분자들을 규명하기 위해 거듭 연구하던 중, 피토크롬과 상호작용을 하는 신규 단백질을 찾아내었고, 이의 기능 및 특성을 규명함으로써 본 발명을 완성하였다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<39> 따라서 본 발명의 목적은 피토크롬과 상호 결합 작용하는 신규 단백질 및 이의 용도를 제공하는 것이다.

【발명의 구성】

<40> 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열 또는 상기 아미노산 서열과 적어도 70% 이상의 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 분리된 폴리펩티드를 제공한다.

<41> 또한, 본 발명은 상기 폴리펩티드를 암호화하는 염기서열 또는 상기 염기서열과 상보적인 염기서열을 갖는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

<42> 본 발명은 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.

<43> 아울러, 본 발명은 상기 재조합 벡터를 포함하는 세포를 제공한다.

<44> 또한, 본 발명은 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 식물체 내로 도입하는 것을 포함하는 광 신호 전달에 민감한 식물체를 제조하는 방법을 제공한다.

<45> 본 발명은 서열번호 4의 1-138의 아미노산 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 식물체 내로 도입하는 것을 포함하는 왜성 식물체(dwarf plant)를 제조하는 방법을 제공한다.

<46> 또한, 본 발명은 상기 폴리펩티드 또는 이의 변이형, 이를 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 이들의 절편 또는 이들의 유도체를 이용하여 피토크롬 신호 전달 관련 물질을 탐색하는 방법을 제공한다.

<47> 본 발명은 서열번호 4의 1-138의 아미노산 서열을 암호화하는 폴리펩티드 또는 이를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 이용하여 식물의 왜소증(dwarfism) 유발 물질을 탐색하는 방법을 제공한다.

<48> 나아가, 본 발명은 상기 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 이용하여 탈인산화효소 활성을 갖는 단백질을 제조하는 방법을 제공한다.

<49> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

<50> 본 발명은 피토크롬과 상호 결합 작용하는 신규 단백질 PAPP5를 제공한다. 상기 PAPP5는 제5형 세린/쓰레오닌 단백질 탈인산화효소(PP5)의 일종이며, 그의 N-말단에는 3개의 TPR(tetratricopeptide repeats) 모티프가 존재하는데, 상기 TPR은 피토크롬과의 상호 결합 작용에 관여한다. 본 발명의 PAPP5의 C-말단은 탈인산화효소 활성을 나타낸다. 상기 효소 활성은 오카다이산(okadaic acid)에 의해 억제되고, 반대로 아라키돈산(arachidonic acid)에 의해 촉진된다. 이와 같은 PAPP5의

효소 활성은 N-말단에 존재하는 TPR 도메인에 의한 알로스테릭 변화에 의해 조절받는다. 또한, 상기 PAPP5는 자가인산화된 피토크롬을 탈인산화시키는 활성을 가지며, 주로 Pfr형의 피토크롬을 탈인산화시킨다.

<51> 본 발명에 따른 단백질은 서열번호 4의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드 및 상기 폴리펩티드의 기능적 동등물을 포함한다. “기능적 동등물”이란 아미노산의 부가, 치환 또는 결실의 결과로 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 70%, 바람직하게는 80%, 보다 바람직하게는 90% 이상의 서열 상동성을 갖는 것으로, 서열번호 4로 표시되는 단백질과 실질적으로 동질의 생리활성을 나타내는 폴리펩티드를 말한다. 여기서, “실질적으로 동질의 생리활성”이란 탈인산화효소 활성을 의미한다. 상기 기능적 동등물에는, 예를 들어, 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드의 아미노산 중 일부가 치환되거나, 결실 또는 부가된 아미노산 서열 변형체가 포함된다. 이 때, 아미노산의 치환은 바람직하게는 보존적 치환이다. 천연에 존재하는 아미노산의 보존적 치환의 예는 다음과 같다; 지방족 아미노산(Gly, Ala, Pro), 소수성 아미노산(Ile, Leu, Val), 방향족 아미노산(Phe, Tyr, Trp), 산성 아미노산 (Asp, Glu), 염기성 아미노산 (His, Lys, Arg, Gln, Asn) 및 황함유 아미노산(Cys, Met). 아미노산의 결실은 바람직하게는 PAPP5의 생리 활성에 직접 관여하지 않는 부분에 위치한다. 본 발명에 따른 단백질의 바람직한 기능적 동등물은 서열번호 4에서 1-138의 아미노산이 결실된 폴리펩티드일 수 있다. 상기 결실 폴리펩티드와 PAPP5는 77.8%의 상동성을 갖는다.

<52> 본 발명에 따른 단백질은 자연(예컨대, 식물 세포)으로부터 추출되거나 또는 본 발명의 폴리펩티드를 암호화하는 재조합 핵산의 발현에 의해 또는 화학적 합성에 의해 수득될 수 있다. 바람직하게는 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)로부터 분리될 수 있다.

<53> 또한, 본 발명은 상기 PAPP5 및 이의 기능적 동등물을 암호화하는 염기서열을 갖는 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 상기 폴리뉴클레오티드는 DNA, cDNA 및 RNA 서열을 모두 포함한다. 즉, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 4의 아미노산 서열 또는 이와 적어도 70% 이상의 상동성을 갖는 아미노산 서열을 암호화하는 염기서열을 갖거나 상기 염기서열에 상보적인 염기서열을 가질 수 있다. 바람직하게는 서열번호 3으로 표시되는 염기서열을 갖는다.

<54> 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 발현 조절 서열에 작동가능하게 연결될 수 있다. “작동 가능하게 연결된다(operably linked)”는 것은 하나의 핵산 단편이 다른 핵산 단편과 결합되어 그의 기능 또는 발현이 다른 핵산 단편에 의해 영향을 받는 것을 말한다. 또한, “발현 조절 서열(expression control sequence)”이란 특정한 세포에서 작동 가능하게 연결된 핵산 서열의 발현을 조절하는 DNA 서열을 의미한다. 그러한 조절 서열은 전사를 개시하기 위한 프로모터(promoter), 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터(operator) 서열, 적합한 mRNA 리보솜 결합 부위를 코딩하는 서열 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함한다.

<55> 본 발명에 따른 폴리뉴클레오티드는 적절한 발현 벡터 내에 삽입될 수 있다. 여기

서, "발현 벡터"라 함은 본 발명의 폴리뉴클레오티드가 삽입될 수 있는 당업계에 공지된 플라스미드, 바이러스 또는 기타 매개체를 의미한다. 식물 세포내로 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 도입시키기 위한 적합한 벡터로는 Ti-플라스미드, 뿌리유도성(Ri)-플라스미드 및 식물 바이러스 벡터가 있으며, 이에 한정되지는 않는다. 바람직하게는 pNB96 벡터를 사용할 수 있다.

<56> 본 발명에 따른 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터는 당업계에 공지된 방법을 사용하여 세포에 도입할 수 있다. 상기에서 세포는 효모, 식물 세포와 같은 진핵세포 또는 대장균과 같은 원핵세포일 수 있다. 바람직하게는 대장균 세포 또는 아그로박테리움 속 미생물 세포이다. 상기 본 발명에 따른 발현 벡터를 숙주 세포에 도입하는 공지된 방법으로는, 이에 한정되지는 않으나, 아그로박테리움 매개 형질전환법(*Agrobacterium*-mediated transformation), 입자 총 충격법(particle gun bombardment), 실리콘 탄화물 위스커(Silicon carbide whiskers), 초음파 처리(sonication), 전기천공법(electroporation) 및 PEG(Polyethyleneglycol)에 의한 침전법 등을 사용할 수 있다. 본 발명은 본 발명의 재조합 벡터로 형질전환된 세포를 제공한다. 상기 세포로는 효모, 식물 세포와 같은 진핵세포 및 대장균 세포와 같은 원핵세포가 포함된다.

<57> 본 발명은 PAPP5를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 식물체 내에서 과발현시킴으로써 광 신호 전달에 민감한 식물체를 제조하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 하기의 단계를 포함한다:

<58> (a) 본 발명의 PAPP5를 암호화하는 염기서열을 갖는 폴리뉴클레오티드를 발현 벡터에 삽입하는 단계; 및

<59> (b) 상기 발현 벡터를 식물체로 도입하는 단계.

<60> 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 3으로 표시되는 염기서열을 갖는 것이 바람직하다. 또한, 상기 방법에 사용될 수 있는 발현 벡터로는 유전자의 과발현을 유도하는 프로모터(예: CaMV 35S 프로모터)가 포함되어 있는 벡터가 바람직하다. 그 예로는 pNB96 벡터가 있다. 상기에서 "과발현"이란, 야생형 식물에서 발현되는 수준 이상으로 유전자가 발현되도록 하는 것을 의미한다. 본 발명에 따른 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터의 식물체로의 도입 방법은 전술한 바와 같으며, 바람직하게는 아그로박테리움 매개 형질전환법을 사용할 수 있다.

<61> 또한, 본 발명은 상기 방법으로 제조된 형질전환 식물체를 제공한다. 상기 방법에 따라 제조된 PAPP5를 과발현하는 식물체는 광 신호 전달에 민감하다는 특징을 갖는다. 즉, 야생형에 비해 지속적인 단파장 적색광 조사 반응(continuous red light-high irradiance response; RC-HIR) 및 지속적인 단파장 원적색광 조사 반응(continuous far-red light-high irradiance response; FRc-HIR)에 대하여 광에 대한 민감성의 현상인 하배축(hypocotyl)이 짧아지는 표현형(de-etiolation)을 더욱 강하게 나타낸다. 또한 피토크롬 B에 의해 매개되는 반응인 “End-Of-Day Far-Red(EOD-FR)” 반응과 피토크롬 A에 의해 매개되는 반응인 안토시안(anthocyanin)의 축적이 야생형에 비해 강하게 나타난다. 상기 PAPP5 과발현 형질전환 식물체는 광 민감성이기 때문에 빛이 약하거나 빛의 양이 적은 조건에서도 생장이 저해를 받지

않아 정상적으로 생장할 수 있는 장점이 있다. 그리고 본 발명은 상기 형질전환 식물체로부터 유래한 식물 조직 및 종자를 제공한다.

<62> 아울러, 본 발명은 PAPP5의 일부 단편을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 식물체 내에서 과발현시킴으로써 왜성 식물체(dwarf plant)를 제조하는 방법을 제공 한다. 상기 방법은 하기의 단계를 포함한다:

<63> (a) 서열번호 4의 1-138의 아미노산 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 식물 발현 벡터에 도입하는 단계; 및

<64> (b) 상기 발현 벡터를 식물체 내로 도입하는 단계.

<65> 상기 폴리뉴클레오티드는 본 발명에 따른 PAPP5의 TPR 도메인을 암호화한다. 바람직하게는 서열번호 4의 1-138에 해당하는 아미노산 서열을 암호화하는 염기서열을 갖는다. 상기 폴리뉴클레오티드를 도입하기 위한 발현 벡터와 식물체로의 도입 방법은 상기 광 민감성 식물체의 제조방법에서 전술한 바와 같다. 바람직하게는 pNB96 벡터를 사용할 수 있으며, 아그로박테리움 매개 형질전환법을 사용할 수 있다. 또한, 본 발명은 상기 방법으로 제조된 형질전환 식물체 및 이로부터 유래한 식물 조직과 종자를 제공한다. 상기 방법으로 제조된 TPR 도메인과 발현 형질전환 식물체는 야생형에 비하여 짧은 신장(shorter height), 다수의 신초(multiple shoots), 꽃 신초 절간(floral shoot internodes) 등의 왜성 표현형(dwarf phenotype)을 나타낸다.

<66> 본 발명에 따른 방법들이 적용될 수 있는 식물은 쌍자엽 식물 (dicotyledonous plant) 또는 단자엽 식물 (monocotyledonous plant)일 수 있다. 상기에서 쌍자엽 식물은 대두, 애기장대, 담배, 가지, 고추, 페튜니아, 감자, 토마토, 배추, 유채, 양배추, 목화, 상추, 복숭아, 배, 딸기, 수박, 참외, 오이, 당근 및 샐러리를 포함한다. 또한 단자엽 식물은 벼, 보리, 밀, 호밀, 옥수수, 사탕수수, 귀리 및 양파를 포함한다.

<67> 본 발명에 따른 PAPP5는 피토크롬 신호 전달에 관여하는 단백질로서, 피토크롬 A 및 피토크롬 B와 교차 상호 결합 작용한다. PAPP5와 피토크롬 간의 상호 결합 작용에는 PAPP5의 N-말단에 위치하는 TPR 도메인의 관여하며, PAPP5의 C-말단 도메인은 탈인산화효소 활성을 지닌다. PAPPP5는 자가인산화된 Pfr 형의 피토크롬에 의하여 활성화되며, 자가인산화된 피토크롬을 탈인산화시키는 효소 활성을 지니고 있다. 따라서 본 발명에 따른 PAPP5 또는 이의 변이형, 이를 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 이들의 절편 또는 유도체를 이용하여 피토크롬 신호 전달 관련 물질을 탐색할 수 있다. 즉, *PAPP5* 유전자와 염기서열을 비교하여 높은 서열 상동성을 가진 유전자를 탐색하거나 또는 상기 유전자들의 일부분을 탐침으로 하여 다른 식물체에서 동일 또는 유사 유전자를 탐색할 수 있다. 또한, *PAPP5* 유전자와 직접적으로 결합하는 물질 또는 상기 유전자의 발현을 억제 또는 활성화하는 물질 등을 탐색할 수 있다. 아울러, PAPP5 또는 이의 변이형의 활성을 억제 또는 활성화하는

물질을 탐색할 수 있다. 상기 물질은 유전자, 단백질 및 화학물질(chemical)을 포함한다. 탐색은 당업계에서 일반적으로 사용되는 cDNA 라이브러리 스크리닝, BAC(bacterial artificial chromosome) 스크리닝, DNA 칩, 단백질 칩, 중합효소 연쇄반응(PCR), 노던 블럿, 서던 블럿, 웨스턴 블럿, 효소 면역 반응(ELISA), 2-D 겔 분석, 효모 2-하이브리드 시스템 및 시험관 내 결합 어세이(in vitro binding assay)를 포함하는 다양한 방법으로 수행될 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

<68> 또한 본 발명의 PAPP5의 TPR 도메인은 상기 기재한 바와 같이 피토크롬 간의 상호 결합 작용에 관여할 뿐 아니라 식물체 내에서 과발현되는 경우 식물의 왜소증(dwarfism)을 유발한다. TPR 도메인의 과발현이 식물의 왜소증을 유발한다는 것은 본 발명에서 처음으로 규명된 것이다. 따라서 상기 TPR 도메인은 식물의 왜소증 유발 물질을 탐색하는데 사용될 수 있다. 즉, PAPP5의 TPR 도메인의 발현을 유도 또는 촉진하거나 상기 TPR 도메인과 상호 작용하여 식물의 왜소증을 간접적으로 또는 직접적으로 유발하는 물질 등을 탐색할 수 있다. 탐색 방법은 상기에서 기재한 바와 같다.

<69> 나아가, 본 발명은 본 발명에 따른 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 이용하여 탈인산화효소 활성을 갖는 단백질을 생산하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 하기의 단계를 포함한다:

<70> (a) 서열번호 4의 아미노산 서열 또는 이와 적어도 70% 이상의 상동성을 갖

는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 발현 벡터에 도입하는 단계;

<71> (b) 상기 발현 벡터를 세포에 도입하는 단계;

<72> (c) 상기 세포를 배양하여 상기 폴리뉴클레오티드를 발현시키는 단계; 및

<73> (d) 세포 배양액으로부터 발현된 단백질을 회수하는 단계.

<74> 상기 방법에 사용될 수 있는 폴리뉴클레오티드로는 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 뿐 아니라 상기 아미노산 서열과 적어도 70% 이상의 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 사용할 수 있다. 바람직하게는 서열번호 4의 폴리펩티드 또는 서열번호 4에서 1-138의 아미노산 서열이 결실된 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드일 수 있다. 상기에서 세포는 효모와 같은 진핵세포 또는 대장균과 같은 원핵세포일 수 있다.

<75> 본 발명의 일 실시예에서는 피토크롬과 상호 결합하는 신규한 단백질을 찾기 위하여, 효모 2-하이브리드 시스템을 이용하여 애기장대 cDNA 라이브러리를 스크리닝하였다. 이 때 베이트(bait)로서 피토크롬 A의 전장 cDNA를 사용하였다(도 1 참조). 효모 2-하이브리드 스크리닝 결과로 얻은 피토크롬과 결합하는 양성 클론들의 추정되는 아미노산 서열을 분석한 결과, 이중 하나의 클론이 제5형 세린/쓰레오닌 단백질 탈인산화효소(PP5)의 일종이라는 것을 확인할 수 있었다. PP5s는 그의

N-말단에 단백질-단백질 상호작용에 관여하는 3-4개의 TPR(tetratricopeptide repeat)를 가지는데(Das, A. K., *et al.*, *EMBO J.*, 17:1192-1199, 1998; Skinner, J. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 272:22464-22471, 1997; Ollendorff, V. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 272:32011-32018, 1998; Chinkers, M. *Trends Endocrinol. Metab.*, 12:28-32, 2001), 상기 선발된 양성 클론의 N-말단에도 3개의 TPR로 구성된 도메인이 존재하였다(**도 2** 및 **도 3** 참조). 또한, 상기 클론의 C-말단에는 세린/쓰레오닌 탈인산화효소 활성에 필수적인 모티프와 오카다이산의 결합에 의해 효소 활성이 저해되는 서열(-SAPNC-)이 보존되어 있었다(**도 3** 참조). 본 발명자들은 상기 선발된 양성 클론을 'PAPP5(phytochrome-associated protein phosphatase 5)'라 명명하였다.

<76> 생체(*In vivo*) 및 시험관 내(*In vitro*) 단백질-단백질 상호 결합 분석 결과, 본 발명의 PAPP5는 피토크롬과 특이적으로 상호 결합 작용하였으며(**도 4** 및 **도 5** 참조), 상기 상호작용에는 PAPP5의 N-말단에 존재하는 TPR 도메인이 관여하는 것으로 확인되었다(**도 6** 참조). 또한, 탈인산화효소의 일반적인 무기 기질인 파라-인산니트로페놀(p-NPP)에 대한 PAPP5의 효소 활성을 조사한 결과, 알로스테릭한 구조 변화(allosteric conformational change)에 의존적인 활성을 갖는다는 사실을 확인할 수 있었다. 이러한 구조변화는 시험관 내에서 아라키돈산에 의해 유도되었으며(**도 7** 참조), 이는 상기 TPR 도메인이 자기억제(autoinhibitory region)의 활성을 가지고 있음을 제시하는 것이다.

<77> 또한, PAPP5는 시험관 내에서 자가인산화된 피토크롬을 효율적으로 탈인산화

시켰으며, 상기 탈인산화효소 활성을 빛의 파장에 의해 조절 받는 것으로 확인되었다(도 11 참조). 특히, PAPP5에 의한 피토크롬의 탈인산화 현상은 주로 Pfr형에서 강하게 나타났다. 상기 생체 내 및 시험관 내 결과는 PAPP5가 피토크롬에 의해 매개되는 광 신호 경로(phytochrome-mediated light signalling pathways)의 조절자라는 것을 제시한다. 또한, PAPP5가 관여하는 가역적인 피토크롬의 인산화/탈인산화가 피토크롬의 생물학적 활성을 및 피토크롬에 의해 매개되는 광 신호전달(light signal transduction)의 조절에 중요한 역할을 한다는 것을 제시한다.

<78> 본 발명의 다른 실시예에서는 PAPP5의 N-말단 또는 C-말단 결실 돌연변이의 탈인산화효소 활성을 조사한 결과, PAPP5의 N-말단 결실 돌연변이가 탈인산화효소 활성을 그대로 보유하고 있음을 확인하였다(도 7의 C 참조).

<79> PP5s의 탈인산화효소 활성을 아라키돈산에 의해 촉진되는 것으로 알려져 있으므로 (Das, A. K., *et al.*, *EMBO J.*, 17:1192-1199, 1998; Skinner, J. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 272:22464-22471, 1997; Ollendorff, V. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 272:32011-32018, 1998; Chinkers, M. *Trends Endocrinol. Metab.*, 12:28-32, 2001), 아라키돈산에 의한 PAPP5의 효소 활성 유도를 조사하였다. 그 결과, 전장 PAPP5의 탈인산화효소 활성 또한 아라키돈산에 의해 높은 수준으로 유도됨을 알 수 있었다(도 7의 C 참조). 한편, PAPP5의 N-말단 결실 돌연변이는 아라키돈산에 의해 유도된 PAPP5의 탈인산화효소 활성과 동등하거나, 보다 높은 수준의 활성을 나타내었으며, 그 활성은 아라키돈산에 의존적이지 않았다.

<80> 본 발명의 또 다른 실시예에서는 PAPP5 녹-아웃 변이체와 PAPP5 과발현 식물체를 제조하여 이들의 Rc-HIR 및 FRc-HIR 표현형을 조사하였다. 그 결과, PAPP5 녹-아웃 변이체의 경우에는 과발현 식물체와는 반대로 긴 하배축 표현형을 나타내었으며(**도 9** 참조), 광-유도 후크 오프닝(light-induced hook opening) 및 자엽분리(cotyledon separation)의 감소율, 감소된 자엽 신장(cotyledon expansion), 감소된 자엽 과 조기 개화(early flowering)를 관찰할 수 있었다(결과 미도시). 반면, PAPP5 과발현 식물체는 야생형에 비해 짧은 하배축 표현형을 나타내었으며(**도 9** 참조), 피토크롬 B에 의해 매개되는 반응인 “End-Of-Day Far-Red(EOD-FR)” 반응과 피토크롬 A에 의해 매개되는 반응인 안토시안(anthocyanin)의 축적이 강하게 나타났다(결과 미도시). 이러한 결과는 PAPP5가 피토크롬 A 및 피토크롬 B 신호 경로(signalling pathway)에서 양성 조절자(positive regulator)로서 기능한다는 것을 나타낸다.

<81> 본 발명의 다른 실시예에서는 PAPP5의 TPR 도메인의 역할을 더 조사하기 위하여 우성 음성 돌연변이(dominant negative mutation)의 역 유전학적(reverse genetics) 접근을 이용하였다. 이를 위해, PAPP5의 TPR 도메인(서열번호 4의 1-138의 아미노산 서열로 구성된 폴리펩티드)을 야생형 식물체에서 과발현시켰다. 그 결과, TPR 도메인의 과발현 식물체는 지베렐린 결핍에 의한 표현형과 유사한 표현형을 나타내었으며, 짧은 신장(short height), 다수의 신초(multiple shoots) 및

꽃 신초 절간(floral shoot internodes)의 왜성 표현형을 나타내었다.

<82> 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

<83> 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<84> **<실시예 1>**

효모 2-하이브리드 스크리닝(yeast two-hybrid screening)

<86> 본 발명자들은 피토크롬에 결합하는 단백질을 탐색하기 위하여 효모 2-하이브리드 시스템(DupLEX-ATM, Origene Technologies)을 이용하였다. 먼저, 당업계에 공지된 방법에 따라 3주령 애기장대로부터 cDNA 라이브러리를 제작하였다. 각 cDNA 단편을 pJG4-5 플라스미드(Origene Technologies)에 삽입하였다(프레이(prey) 제조). 한편, 베이트(bait)는 pGilda(Origene Technologies)의 LexA-DNA 결합 도메인에 피토크롬 A의 유전자인 *PHYA*를 연결하여 제작하였다(도 1 참조). 이를 위해 미국 캘리포니아 샌디에고 소재 SALK 연구소의 조안 코리 박사로부터 제공받은 *PHYA* cDNA 클론으로부터 서열번호 1 및 서열번호 2로 표시되는 프라이머를 사용하여 피토크롬 A 유전자를 클로닝하였다. 이 때 PCR 반응은 94°C에서 5분 동안 주형 DNA를 전 변성시킨 후, 94°C에서 30초; 50°C에서 30초; 및 72°C에서 2분 30초간의 조건을 한 사이클로 하여 총 35회 반복 수행한 다음, 72°C에서 15분 동안 반응시키는 조건으로 수행하였다. 이후, pSH18-34 리포터 플라스미드가 도입된 EGY48 효모

리포터 균주(Origen Technologies)를 상기 애기장대 cDNA 단편을 포함하는 프레이와 *PHYA* 유전자를 포함하는 베이트로 공동 형질전환시켰다. 총 7×10^6 개의 콜로니를 스크리닝한 결과, Leu- 와 β -갈락토시다아제에 대해 양성반응을 보이는 약 150개의 콜로니를 얻었다.

<87> <실시예 2>

<88> 양성 클론의 염기서열 분석

<89> 상기 실시예 1의 효모 2-하이브리드 스크리닝에서 얻은 양성 클론으로부터

플라스미드를 분리한 후, 각 cDNA 클론의 염기 서열을 결정하였다. 이후, 애기장대 게놈 데이터베이스를 이용하여 상동성 검색을 수행하였다. 그 결과, cDNA 클론 중 하나가 2번 염색체의 BAC 클론 F14N22와 F7D19 상의 서열과 상동성을 보임을 확인하였다. 상기 cDNA 클론을 분석한 결과, 상기 cDNA 클론의 코딩 지역 안에 13개의 엑손과 12개의 인트론이 존재하였으며(도 2 참조), 484개의 아미노산을 암호화하는 해독부(Open Reading Frame; ORF)가 포함되어 있는 것으로 확인되었다. 또한, 그 분자량은 54kDa로 추정되었다. 추정된 아미노산 서열을 NCBI BLAST로 분석한 결과, 상기 cDNA 클론으로부터 암호화되는 단백질은 다른 여러 종에서 규명된 제5형 세린/쓰레오닌 단백질 탈인산화효소(PP5s)와 높은 상동성을 보였다. 상기 단백질의 아미노산 서열을 다른 여러 종의 PP5s와 쌍정렬(pairwise alignment)한 결과(도 3 참조), 전체 상동성(identity)이 50-57%이었으며, C-말단 촉매 도메인은

약간 더 높은 54-62%의 상동성을 나타내었다. 그러나, 아미노산 서열의 유사성(similarity)은 70% 이상으로 매우 높았다.

<90> 한편, 프로사이트(PROSITE) 분석 결과, 지금까지 모든 PP5s에서 발견된 TPR(tetratricopeptide repeat)이 상기 단백질의 N-말단에 존재하고 있음을 확인하였다. 또한 상기 단백질의 C-말단에는 높게 보존된 제2형 세린/쓰레오닌 단백질 탈인산화효소(PP2A) 도메인이 존재하였으며, 그 내부에는 세린/쓰레오닌 탈인산화효소의 활성에 필수적인 모티프(-GDXHGQ-, -GDXVXRG- 및 -RGNHE-)가 포함되어 있었다(**도 3** 참조). 상기 보존된 3개의 모티프들은 촉매작용(catalysis), 기질 결합 및 금속이온 결합에 중요한 역할을 한다(Ollendorff, V. et al., *J. Biol. Chem.*, 272:32011-32018, 1998). 또한 상기 단백질의 C-말단은 오카다의 산이 결합하여 효소활성을 저해하는 것으로 알려진 보존서열(consensus sequence)인 'SAPNYC'(Ollendorff, V. et al., *J. Biol. Chem.*, 272:32011-32018, 1998)을 포함하고 있었다(**도 3** 참조). 상기 결과로부터 상기 cDNA 클론이 세린/쓰레오닌 단백질 탈인산화효소를 암호화하는 것을 확인할 수 있었다.

<91> 본 발명자들은 상기 cDNA 클론을 '*PAPP5*(phytochrome-a ssociated p rotein phosphatase 5)'라 명명하였다. 상기 *PAPP5*의 전장 cDNA 염기서열과 이로부터 추정되는 아미노산 서열을 서열번호 3 및 서열번호 4로 각각 기재하였다.

<92> 한편, 노던 블럿 분석 결과, 상기 *PAPP5*의 cDNA는 전체 길이 약 2kb 크기의 단일 전사체와 유사한 것으로 확인되었으며, 또한 서던 블럿 분석을 통해서는 *PAPP5*가 단일 카피(single copy) 유전자임을 확인되었다(결과 미도시).

<93> <실시예 3>

<94> PAPP5와 피토크롬 간 상호 결합 작용의 분자적 특이성 조사

<95> pGilda 벡터와 pJG4-5 벡터(Origen Technologies)를 이용하여 프레이와 베이트를 각각 제조하였다(**도 4** 참조). 이 때, 특이적 결합을 확인하기 위한 대조구로 C형 간염 바이러스(HCV)의 단백질인 NS5A(N)(포항공과대학교 생명과학과 장승기 박사로부터 분양받음)와 TPR 도메인을 가지는 식물의 다른 단백질인 SPINDLY(SPY)(Jacobsen, S. E., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93:9292-9296, 1996)를 이용하였다. 뿐만 아니라, 프레이/베이트를 서로 바꾸어 호혜적인 방법(reciprocal method)으로 단백질간 결합을 관찰하였다. 제조된 프레이와 베이트를 pSH18-34 리포터 플라스미드(Origen Technologies)와 함께 EGY48 효모 균주(Origen Technologies)에 공동 도입하였다. 이후, X-gal(5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside; Rose Scientific Ltd.)를 포함하는 배지에서 형질전환체들을 선별하였다. Leu 결핍 배지(Leu-drop out media) 및 X-gal 배지 상에서 플레이트 생장 분석(plate-growth assay)을 수행하였다.

<96> 그 결과, PAPP5는 HCV의 NS5A(N)단백질과는 상호작용하지 않는 반면, 애기장 대 피토크롬 A와 특이적으로 상호 결합 작용하는 것을 확인할 수 있었다(**도 4** 참조). 더불어, TPR 도메인을 가지고 있는 다른 식물 단백질인 SPY는 피토크롬과는 상호작용하지 않는 것으로 보아 PAPP5와 피토크롬 간의 결합은 매우 특이적인 결합임을 알 수 있었다.

<97>

<실시예 4>

<98>

시험관 내 결합 분석(*In vitro* binding assay)

<99>

<4-1> GST-PAPP5 융합 단백질의 발현 및 정제

<100>

PAPP5와 피토크롬 간의 시험관 내 상호작용을 조사하기 위하여, pGEX4T-1 벡터(Amersham Pharmacia Biotech.)를 이용하여 전장 *PAPP5*을 발현시키기 위한 벡터

를 제작하였다. 먼저, 서열번호 5 및 서열번호 6으로 기재되는 프라이머를 이용하여 전장 *PAPP5*을 증폭하였다. 이 때 PCR 반응은 94°C에서 5분 동안 주형 DNA를 전변성시킨 후, 94°C에서 30초; 50°C에서 30초; 및 72°C에서 1분간의 조건을 한 사이클로 하여 총 30회 반복 수행한 다음, 72°C에서 10분 동안 반응시키는 조건으로 수행하였다. 이후, 증폭된 PCR 산물을 pGEX4T-1 벡터(Amersham Pharmacia Biotech.)에 클로닝하였다. *PAPP5*를 포함하는 재조합 벡터를 대장균 BL21에 도입하였다.

형질전환체를 1mM IPTG와 함께 배양하여 GST-PAPP5 융합 단백질을 발현시켰다. 발현된 GST-PAPP5 융합 단백질을 글루타치온-세파로즈 4B 비드(Amersham Pharmacia Biotech)를 이용하여 정제하였다(Skinner, J. et al., *J. Biol. Chem.*, 272:22464-22471, 1997). 단백질을 천연의 상태로 정제하기 위하여, GST-PAPP5 융합 단백질을 50mM Tris-HCl pH8.0, 4mM MnCl₂, 0.1% β -мер캅토에탄올 및 10mM 글루타치온을 포함하는 완충용액으로 용출하였다. 이후, 25% 글리세롤, 1mM EGTA, 0.1% β -мер캅토에탄올, 20mM Tris-HCl pH7.6 및 4mM MgCl₂를 용액으로 4°C에서 하룻밤 동안 투석

하였다. 투석된 단백질 시료를 분석에 사용할 때까지 -20°C에서 보관하였다.

<101> <4-2> PHYA 및 PHYB 발현 벡터 구축

<102> 시험관 내 전사/번역 시스템을 이용하여 애기장대 피토크롬 A와 B의 아포프

로테인인 PHYA 및 PHYB를 발현시켰다.

<103> 먼저, 시험관 내에서 PHYA의 합성을 위해, 서열번호 7 및 서열번호 2로 기재

되는 프라이머를 이용하여 양쪽 끝에 각각 *Bam*HI과 *Xho*I의 제한효소 인식서열을 포

함하는 PHYA의 전장 cDNA를 PCR로 증폭하였다. 이 때 PCR 반응은 94°C에서 5분 동

안 주형 DNA를 전 변성시킨 후, 94°C에서 30초; 50°C에서 30초; 및 72°C에서 2분

30초간의 조건을 한 사이클로 하여 총 30회 반복 수행한 다음, 72°C에서 10분 동안

반응시키는 조건으로 수행하였다. 이후, 증폭된 PCR 산물을 pTr iEx-1 벡터

(Novagen)의 *Bam*HI-*Xho*I 부위에 삽입하여 PHYA의 발현을 위한 재조합 발현 벡터를

제조하였다. 한편, PHYB의 합성을 위해 서열번호 8 및 서열번호 9로 기재되는 프

라이머를 이용하여 *Fba* I -전장 *PHYB* cDNA-*Eco*52I의 서열을 가지는 PCR 산물을 증폭

하였다. 이를 pTr iEx-1 벡터의 *Bam*HI-*Xho*I 부위에 삽입하여 PHYB의 발현을 위한

재조합 발현 벡터를 제조하였다. 암호화된 각 단백질들을 35 S-표지된 메티오닌을

이용하여 각각 시험관 내에서 합성하였다. 이 때 합성은 망상 적혈구 TnT 전사/번

역 시스템(reticulocyte TnT transcription/translation system; Promega)을 이용

하여 제조사의 권장방법에 따라 수행하였다.

<104> **<4-3> 시험관 내 결합 분석**

<105> 상기 실시에 <4-1>에서 제조한 GST-PAPP5 융합 단백질 1 μ g과 상기 실시에

<4-2>에서 제조한 각 TnT 단백질 10 μ l을 단백질 분해효소 저해제(protease inhibitor, Complete, Roche Diagnostics GmbH)와 함께 결합 완충용액(20mM Tris-HCl, pH7.5, 150mM NaCl, 1mM dithiothreitol, 0.1% Tween 20) 0.3m ℓ 에 첨가하였다. 이후, 4°C에서 약하게 회전시켜 주면서 결합반응을 유도하였다. 10 μ l의 글루타치온 세파로즈 4B 비드(Amersham Pharmacia Biotech. AB)를 더 첨가한 후, 동일한 조건으로 1시간 더 반응시켰다. 원심분리 후, 상등액 부분은 따로 보관하고, 펠렛(세파로즈 비드 분획)은 1m ℓ 의 결합 완충용액으로 3회 세척하였다. 펠렛과 상등액 분획(fraction)을 10% 아크릴아미드가 첨가된 SDS-PAGE 젤로 분석하였다. 이후, 후지 FLA-2000R 이미지 분석기(Fuji Photo Film)를 이용하여 시각화하였다.

<106> 그 결과, PAPP5가 애기장대의 피토크롬 A 및 피토크롬 B 모두와 결합하는 성

질을 가지고 있음을 확인할 수 있었다(**도 5** 참조).

<107> **<실시 예 5>**

<108> **PAPP5의 TPR 도메인과 피토크롬 간의 상호작용 조사**

<109> 본 발명의 PAPP5를 포함하는 PP5s들은 여러 개의 TPRs로 이루어진 독특한 N-

말단 도메인을 포함하고 있는 점에서 PP1/PP2 군의 다른 멤버와 구별된다. TPR 모티프들은 양친매적 나선(amphipathic helices)을 형성하는 것으로 추정되며, 단백질-단백질 상호작용을 매개하는 것으로 알려졌다(Das, A. K., *et al.*, *EMBO J.*, 17:1192-1199, 1998; Skinner, J. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 272:22464-22471, 1997; Ollendorff, V. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 272:32011-32018, 1998; Chinkers, M. *Trends Endocrinol. Metab.*, 12:28-32, 2001). 따라서, 본 발명에 따른 PAPP5 와 피토크롬 분자 간의 결합작용에 TPR이 관여 하는지 알아보기 위하여, 풀-다운 분석(pull-down assay)과 효모 2-하이브리드 상호작용 정량 분석을 수행하였다.

<110> <5-1> 풀-다운 분석

<111> 상기 실시예 <4-1>과 동일한 방법에 따라 pGEX4T-1 벡터(Amersham Pharmacia Biotech)를 이용하여 서열번호 4의 1-138의 아미노산 서열로 이루어진 PAPP5의 TPR 도메인(N-말단 도메인;GST-TPR) 및 서열번호 4에서 1-138의 아미노산 서열이 결실된 PAPP5의 PP2A 효소 도메인(C-말단 도메인; GST-PP2Ac)을 위한 재조합 발현 벡터를 각각 제작하였다.

<112> PAPP5의 TPR 도메인은 서열번호 5 및 서열번호 10으로 표시되는 프라이머를 이용하여 PCR로 증폭하였다. PCR 반응은 94°C에서 5분 동안 주형 DNA를 전 변성시킨 후, 94°C에서 30초; 50°C에서 30초; 및 72°C에서 1분간의 조건을 한 사이클로 하여 총 30회 반복 수행한 다음, 72°C에서 10분 동안 반응시키는 조건으로 수행하였다. 한편, PAPP5의 PP2A 촉매 도메인은 서열번호 6 및 서열번호 11로 표시되는

프라이머를 이용하여 PCR로 증폭하였다. PCR 반응은 94°C에서 5분 동안 주형 DNA를 전 변성시킨 후, 94°C에서 30초; 50°C에서 30초; 및 72°C에서 1분간의 조건을 한 사이클로 하여 총 30회 반복 수행한 다음, 72°C에서 10분 동안 반응시키는 조건으로 수행하였다. 이후, 상기 실시예 <4-1>와 동일한 방법에 따라 대장균 내에서 발현시켜 정제한 각 단백질을 대상으로 시험관 내 결합 분석을 수행하였다.

<113> 그 결과, 도 6A에서 보는 바와 같이, GST와 융합된 PAPP5의 TPR 도메인(GST-TPR)만이 피토크롬 분자와 상호결합에 대한 능력을 가지는 것으로 확인되었다. 이는 PAPP5가 피토크롬 분자에 결합하는 데 TPR 도메인이 관여한다는 것을 나타내는 것이다.

<114> <5-2> 효모 2-하이브리드 상호 결합 작용 정량 분석(Quantitative yeast two-hybrid interaction assay)

<115> PAPP5의 TPR 도메인과 피토크롬 간의 상호 결합 작용을 정량 분석하기 위하여, PAPP5의 TPR 도메인 및 PAPP5의 PP2A 촉매 도메인을 위한 재조합 벡터(프레이)를 각각 제조하였다.

<116> *PHYA* 유전자 또는 *PHYB* 유전자는 상기 실시예 <4-2>와 동일한 방법에 따라 PCR을 수행하여 준비하였으며, pG11da 벡터에 삽입하여 이를 베이트로 사용하였다. 제조된 베이트 또는 프레이를 pSH18-34 리포터 플라스미드와 함께 EGY48 효모 균주에 공동 도입하였다. 형질전환된 균주를 OD₆₀₀ 값이 약 0.7이 될 때까지

배양하였다. 배양된 세포를 Z-완충용액(60mM Na₂HPO₄, 40mM NaH₂PO₄, 10mM KCl, 1mM MgSO₄, pH 7.0)으로 1회 세척한 후, 상기 용액에 재현탁시켰다. 이후, 액체 N₂로 동결시켰다. 동결된 용액을 재용해시킨 후, β -미캡토에탄올(β -mercaptoethanol)과 ONPG(o-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside)를 최종 농도 0.2% 및 0.67mg/ml로 각각 첨가하였다. 용해물을 30분 동안 37°C에서 반응시켰다. 이후, Na₂CO₃를 최종농도 0.3M으로 첨가하여 반응을 종결시켰다. 420nm에서 흡광도를 측정하였으며, β -갈락토시다아제 활성을 밀러 단위(Miller unit)로 결정하였다 (Miller, J. H. *Experiments in Molecular Genetics*(Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring harbor, New York, 1972)).

<117> 그 결과, 도 6B에서 보는 바와 같이, TPR 도메인이 결실된 PAPP5의 PP2A 촉매 도메인(B42-PP2Ac)은 피토크롬-상호작용 활성에 대하여 현저히 감소된 효과를 나타내었다. 상기 결과는 PAPP5의 TPR 도메인이 PAPP5-피토크롬 분자 간의 상호 결합작용을 위한 특이적 부위라는 것을 재입증하는 것이다. 또한 이는 상기 풀-다운 분석 결과와 일치하는 것이다.

<실시예 6>

<118> 시험관 내 탈인산화효소 활성 분석(*In vitro* phosphatase assay)

<6-1> 탈인산화효소 활성 측정

<121> 본 발명에 따른 PAPP5가 효소학적으로 활성을 가지는지 알아보기 위하여, 무

기 파라-인산니트로페놀(ρ -nitrophenyl phosphate; ρ NPP)을 기질로 사용하여 효소 분석을 하였다. 먼저, 상기 실시예 <4-1>에서 정제된 GST-PAPP5 융합 단백질을 30°C에서 1분 동안 예열하였다. 예열된 효소 용액을 0-400mM ρ NPP를 포함하는 인산화효소/탈인산화효소(KP) 완충용액(20mM Tris-HCl pH7.5, 30mM MgCl₂, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 0.1% β -mercaptoethanol, 0.1% ethanol) 100 μ l에 첨가하여 반응을 개시하였다. 각 기질 농도에서의 ρ NPP의 자발적인 가수분해를 조사하기 위하여 대조구에는 GST-PAPP5 효소 용액을 첨가하지 않았다. 30°C에서 15분 동안 반응시킨 후, 0.25N NaOH 900 μ l를 첨가하여 반응을 종결시켰다. 410nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소를 제외한 모든 구성성분을 포함하는 대조구 반응액의 흡광도 수치를 공제한 후, 파라-니트로페놀레이트(ρ -nitrophenolate) 이온의 mM 흡광 계수(millimolar extinction coefficient) 17.8을 이용하여 비율(rate)을 계산하였다.

<122> 그 결과, 도 7A에서 보는 바와 같이, ρ NPP의 농도가 증가함에 따라 탈인산화효소 활성이 증가함을 확인할 수 있었다. 이는 본 발명에 따른 PAPP5가 탈인산화효소 활성을 소유하고 있음을 나타내는 것이다. 이에 100 μ M 아라키돈산의 존재 하에서 효소-기질 반응을 미켈리스-멘텐 식(Michaelis-Menten kinetic)으로 K_m 값과 V_{max} 값을 계산한 결과, K_m 값은 160mM ρ NPP였고, V_{max} 값은 22 μ mol Pi released/min/mg이었다.

<6-2> 아라키돈산에 의한 PAPP5의 촉매 활성 유도 측정

<124> PP5s의 가장 두드러진 특징은 아라키돈산에 의해 그의 촉매 활성(catalytic activity)이 유도된다는 것이다(Das, A. K., et al., *EMBO J.*, 17:1192-1199, 1998; Skinner, J. et al., *J. Biol. Chem.*, 272:22464-22471, 1997; Ollendorff, V. et al., *J. Biol. Chem.*, 272:32011-32018, 1998; Chinkers, M. *Trends Endocrinol. Metab.*, 12:28-32, 2001). 본 발명에 따른 PAPP5의 탈인산화효소 활성이 아라키돈산에 의해 활성화되는지 확인하기 위하여, 100mM의 ρ NPP의 농도하에서 0-300 μ M 아라키돈산을 반응 혼합물에 첨가하여 상기 실시예 <6-1>과 동일한 방법에 따라 효소활성을 측정하였다.

<125> 그 결과, GST-PAPP5의 활성이 아라키돈산에 의해 농도 의존적으로 증가되었으며, 아라키돈산의 농도가 약 100 μ M 이상에서 최대 효과 단계(stationary phase)에 도달하였다(**도 7B** 참조).

<126> 또한, PP5s의 촉매활성은 오카다이산에 의해 시험관 내에서 억제된다고 보고 된 바 있다(Das, A. K., et al., *EMBO J.*, 17:1192-1199, 1998; Skinner, J. et al., *J. Biol. Chem.*, 272:22464-22471, 1997; Ollendorff, V. et al., *J. Biol. Chem.*, 272:32011-32018, 1998; Chinkers, M. *Trends Endocrinol. Metab.*, 12:28-32, 2001). 따라서, GST-PAPP5의 탈인산화효소 활성에 대한 오카다이산의 저해 효과를 조사하였다. 그 결과, 효소활성이 반으로 저해되는 농도 값인 IC_{50} 값이 5nM 이었다(결과 미도시).

<127> 상기 결과들은 본 발명에 따른 PAPP5가 세린/쓰레오닌 단백질 탈인산화효소 과(family)에서 PP5 아과(PP5 subfamily)에 속하는 단백질을 암호화한다는 것을 증명하는 것이다.

<128> <6-3> 알로스테릭 구조 변화에 따른 효소 활성 조사

<129> 다른 종에서 분리된 PP5s에 대한 이전의 연구결과들에 의하여 TPR 모티프를 포함하는 PP5s의 N-말단 단편이 알로스테릭 구조 변화를 나타낸다는 사실이 규명된 바 있다(Das, A. K., *et al.*, *EMBO J.*, 17:1192-1199, 1998; Skinner, J. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 272:22464-22471, 1997; Ollendorff, V. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 272:32011-32018, 1998; Chinkers, M. *Trends Endocrinol. Metab.*, 12:28-32, 2001). 따라서, 본 발명자들은 PAPP5도 상기와 같은 특성을 가지고 있는지 확인하기 위하여, GST-PAPP5, GST-TPR 및 GST-PP2Ac의 탈인산화효소 활성을 상기 실시예 <6-1>과 동일한 방법에 따라 조사하였다. 이 때 ρ NPP의 농도는 100mM로 하였다.

<130> 그 결과, 도 7C에서 보는 바와 같이 GST-PAPP5의 탈인산화효소 활성은 아라키돈산에 의하여 약 5배 정도 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 반면, TPR 도메인 (1-138)이 제거된 GST-PP2Ac는 아라키돈산의 첨가에 상관없이 아라키돈산이 없을 때의 GST-PAPP5보다 5배 정도 더 높은 활성을 나타내었다.

<131> 상기 결과는 PAPP5의 탈인산화효소 활성이 다른 PP5s와 유사하게 N-말단 TPR 도메인의 알로스테릭 구조변화에 의해 조절받는 것을 나타내며, 한편으로, 상기

TPR 도메인이 자기억제(autoinhibitory region)의 활성도 가지고 있음을 제시하는 것이다. 또한, 상기 결과로부터 TPR 도메인이 결실된 PAPP5의 PP2A 촉매 도메인을 탈인산화효소로 사용할 수 있음을 확인할 수 있었다.

<132> <실시예 7>

<133> PAPP5의 불활성화 또는 과발현에 따른 식물체의 표현형 조사

<134> PAPP5가 생체 내 피로크롬 매개 광 신호전달에 직접 관여하는지 알아보기 위하여, *PAPP5* 유전자에 대한 녹-아웃 변이체 및 PAPP5 과발현 식물체를 제조하여 이들의 표현형을 조사하였다.

<135> <7-1> *PAPP5* 유전자의 녹-아웃 변이체 탐색

<136> *PAPP5* 유전자의 T-DNA 삽입 돌연변이를 탐색하여 2개의 돌연변이체 라인 (*papp5-1* 및 *papp5-2*)을 구축하였다.

<137> 한 돌연변이체인 *papp5-1*은 Col-0 야생형에서 제조된 개별적 T-DNA 돌연변이 집단(separate T-DNA mutagenized population)(SIGnAL T-DNA Express (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>), Salk Institute Genomic Analysis Laboratory)으로부터 얻었다. 상기 돌연변이체에서 T-DNA는 제1인트론(1st intro n)에 삽입된 것으로 확인되었으며(도 8A 참조), 이로부터 *papp5-1*이 무기능 대립인자(null allele)임이 예측되었다. 또 다른 돌연변이체인 *papp5-2*는 Ws-2 야생형에서 제조된 녹-아웃 돌연변이체 집단(Krysan, P. J., et al., *Plant Cell*, 11:2283-

2290, 1999)으로부터 분리한 DNA들을 스크리닝하여 분리하였다. *papp5-2*에서 T-DNA는 제12인트론에 삽입된 것으로 확인되었다(**도 8A** 참조).

<138> 약제-저항성 표지(카나마이신 저항성 유전자)에 대한 분리도를 조사한 결과, *papp5-1*과 *papp5-2* 모두 단일의 T-DNA가 *PAPP5* 유전자위에 삽입된 것으로 확인되었다. 상기 무기능 대립인자를 가지고 있는 두 돌연변이 라인에 대하여 여러 약제-저항성 유묘들을 증식시켰다. 이후, 각 식물체의 자손들을 대상으로 약제 저항성을 스크리닝하여 상동형 라인(homozygous line)을 선별하였다. 돌연변이체 라인의 상동성(homozygosity)들은 서던 블럿 분석(Southern blot analysis)과 PCR로 확인하였다(결과 미도시).

<139> <7-2> PAPP5 과발현 식물체 제조

<140> 서열번호 12 및 서열번호 13으로 표시되는 프라이머를 이용하여 *PAPP5* cDNA를 증폭하였다. 이 때 PCR 반응은 94°C에서 5분 동안 주형 DNA를 전 변성시킨 후, 94°C에서 30초; 50°C에서 30초; 및 72°C에서 1분간의 조건을 한 사이클로 하여 총 30회 반복 수행한 다음, 72°C에서 10분 동안 반응시키는 조건으로 수행하였다. 이후, 증폭된 PCR 산물을 이중의 35S CaMV 프로모터(dual 35S pro)와 그 하류에 35S CaMV 터미네이터(35S ter)가 있는 pNB96 벡터에 클로닝하였다. 상기 재조합 벡터를 전기충격법(electroporation)으로 아그로박테리움 AGL1에 도입하였다. 이후, 화기 수침 방법(floral-dip method)(Clough, S. J. & Bent, A. F. *Plant J.*, 16:735-743, 1998)에 따라 상기 형질전환된 아그로박테리움으로 애기장대를 형질전

활시켰다. $25\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 DL-PPT(DL-phosphinothricin, Duchefa Biochemie BV)를 이용하여 PAPP5가 과발현되는 독립적인 형질전환체 2개체를 선발하였다. 선발된 2 개체를 각각 '*PAPP5-OX1*' 및 '*PAPP5-OX2*'로 명명하였다.

<141> **<7-3> 녹아웃 변이체 및 과발현 식물체의 확인 및 분석**

<142> a. 노던 블럿 분석

<143> *PAPP5* 전사체 수준을 분석하기 위하여, 알엔이지 식물 미니 컫트(RNeasy plant mini kits)(Qiagen, Valencia, CA)를 이용하여 상기 실시예 <7-1> 및 <7-2>에서 얻은 식물체로부터 전체 RNA를 분리하였다. 전체 RNA $10\mu\text{g}$ 을 포름알데히드를 포함하는 1.0% 아가로스 젤 상에서 분리한 후, 나일론 막으로 트랜스퍼하였다. 상기 막에 *PAPP5* 유전자에 특이적인 ^{32}P -표지된 탐침(서열번호 3의 300-700bp에 해당하는 단편)과 함께 혼성화시켰다. 이후, 후지 FLA-2000R 이미지 분석기(Fuji photo film)를 이용하여 방사선 시그널을 조사하였다.

<144> 그 결과, 도 8B에서 보는 바와 같이 녹-아웃 변이체인 *papp5-1* 및 *papp5-2*에서는 시그널(*PAPP5* 전사체)이 검출되지 않은 반면, 과발현 식물체인 *PAPP5-OX1* 및 *PAPP5-OX2*에서는 시그널이 검출되었다.

<145> b. 광반응성 조사

<146> 녹-아웃 변이체 및 과발현 식물체 종자들의 표면을 30% 표백제(1.2% sodium

hypogchlorite)와 0.015% 트리톤 X-100으로 10분 동안 소독하였다. 이후, 멸균수로 5회 세척하였다. 춘화처리(vernalization)를 위하여 3일 동안 암/냉처리 (dark/cold-treatment)를 한 후, 종자들을 생장 배지(수크로즈를 포함하지 않는 0.1× Murashige-Skoog; 0.1× MS)를 포함하는 0.8% 피토아가(phytoagar) 배지에 치상하였다. 이후, 플레이트를 $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ 의 백광(F48T12/CW/VHO, Philips)에 12시간 동안 지속적으로 노출시킨 후, 22°C의 암조건에서 12시간 배양하여 발아를 촉진시켰다. 하배축의 길이를 측정하기 전에 4일 동안 다양한 조건(암조건, 지속적인 단파장 적색광(Rc) 및 지속적인 단파장 원적색광(FRc)) 하에 플레이트를 두었다. 광원(light source)은 김병철 박사 등의 논문(Kim, B. C. et al. *Plant J.*, 9:441-456, 1996)에 개시된 대로 사용하였으며, 광도(fluence rate)는 분광방사회 도계(spectroradiometer)(Hanbead Optical Power Meter 840, Newport)를 이용하여 모니터링하였다. 하배축의 길이는 HP 스캔젯 5370C 디지털 스캐너(HP ScanJet 5370C digital scanner, Hewlett Packard)와 사이온 이미지 소프트웨어(Scion image software, Beta 4.0.2, Scion Corporation)를 이용하여 측정하였다. 이 때 야생형 애기장대(Col-0)와 피토크롬 변이체(*phyB-9* 및 *phyA-211*)(*Arabidopsis* Biological Resource Center에서 분양받음)를 대조구 식물체로 이용하였다.

<147> **도 9**는 녹-아웃 변이체(*papp5-1*) 및 PAPP5 과발현 식물체(*PAPP5 OX-2*)의 광

반응성을 조사하기 위해 Rc 및 FRc 광도(fluence rate)에 따른 하배축 길이성장 억제반응 커브를 야생형(Col-0) 및 피토크롬 돌연변이체(*phyB-9*)의 것과 비교하여 도

시한 것이다. 도 9에서 보는 바와 같이, 녹-아웃 변이체 *papp5-1*은 낮은 광도의 Rc 및 FRc에 대해 둔감(hyposensitivity)함을 보인 반면, PAPP5 과발현 식물체들은 Rc 및 FRc에 대하여 과민(hypersensitivity)함을 보였다. 또한 PAPP5 과발현 식물체들에서는 피토크롬 B에 의해 매개되는 반응인 “End-Of-Day Far-Red(EOD-FR)” 반응과 피토크롬 A에 의해 매개되는 반응인 안토시안(anthocyanin)의 축적이 야생형에 비해 강하게 나타나는 것을 확인할 수 있었다(결과 미도시). 이러한 광-의존 표현형의 강도는 *PAPP5* 전사체 수준과 상호 관련이 있는 것으로 확인되었다.

<148> 한편, *PAPP5* 유전자의 붕괴에 의해 유도된 녹-아웃 변이체에서는 긴 하배축 표현형 외에도 광-유도 혹 오프닝 및 자엽 분리의 감소율, 감소된 자엽 신장 및 조기 개화(early flowering)가 관찰되었다(결과 미도시). 이로부터 *PAPP5*가 피토크롬에 의해 조절되는 식물의 광형태형성(photomorphogenesis)에 기능적으로 관여한다는 것을 알 수 있었다.

<149> <실시예 8>

<150> 녹-아웃 변이체 및 과발현 식물체에서 광반응 유전자들의 전사체 수준 분석

<151> 피토크롬 매개 광 신호전달에 대한 *PAPP5*의 관여가 유전자 발현 수준에서 발생하는 것인지 확인하기 위하여, 녹-아웃 변이체 및 과발현 식물체에서 빛에 의해 그 발현이 조절되는 것으로 알려진 3가지의 유전자의 발현 수준을 야생형과 비교하여 조사하였다: 양성으로 조절받는 *RBCS* 유전자(GenBank accession No. X15221), *CAB2* 유전자(GenBank accession No. X14564), *CHS* 유전자(GenBank accession No.

BT000596).

<152> 각 식물체의 종자를 $0.1 \times$ MS염을 포함하는 0.8% 피토아가 배지 상에 각각 치상하고, 플레이트를 3일 동안 4°C 의 암조건에 두었다. 발아를 유도하기 위하여 플레이트를 $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ 의 백광에 24시간 동안 노출시켰다. 이후, 유묘를 4일 더 암 조건에서 생장시킨 후, 다음의 광 조건으로 옮겼다:

<153> - Rc : 664nm 파장, $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ 광량에서 2시간 동안 노출시킴

<154> - FRc : 748nm 파장, $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ 광량에서 2시간 동안 노출시킴

<155> 녹색 안전등(green safe light) 하에서 조작을 채취한 후, 이로부터 알렌이지 식물 미니 컫트(Qiagen)를 이용하여 전체 RNA를 분리하였다. 이후, 포름알데히드를 포함하는 1% 아가로스 겔에서 $5\mu\text{g}$ 의 전체 RNA를 분리한 후, 상기 겔을 나일론 막(회사)으로 트랜스퍼하였다. 각 유전자에 특이적인 ^{32}P -표지된 탐침들을 상기 막에 처리하여 혼성화시켰다. 후지 FLA-2000R 이미지 분석기(Fuji Photo Film)로 시그널을 조사하였다.

<156> 그 결과, 도 10에서 보는 바와 같이, 암 처리시에는 *RBCS*, *CAB2* 및 *CHS* mRNA가 모든 식물체에서 낮은 수준으로 검출되었다. 그러나, Rc 및 FRc 조사시 야생형 (Col-0, Ws-2)에서는 상기 세 유전자의 발현이 높은 수준으로 증가하였다. 이는 상기 유전자들의 조절에 피토크롬 A와 피토크롬 B가 관여한다는 사실과 일치하는 결과이다(Nagy, F. & Schaffer, E. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 53:329-355, 2002).

한편, PAPP5 과발현 식물체에서는 Rc 및 FRc 조사시 상기 유전자들의 발현 수준이 야생형에 증가한 것으로 나타났다. 반면, 녹아웃 변이체들(*papp5-1*, *papp5-2*)에서는 상기 유전자들의 발현이 암처리시보다 증가하기는 하였으나, 그 정도가 야생형의 경우에 비하여 낮았다. 이는 녹아웃 변이체에서 *RBCS*, *CAB2* 및 *CHS* 유전자들의 광반응성이 야생형에 비해 민감하지 않다는 것을 나타내는 것이다. 상기 결과로부터 *PAPP5* 무기능 돌연변이에 의해 광 반응성 유전자들에 대한 피토크롬의 신호전달 능이 저하됨을 알 수 있었다.

<157> <실시예 9>

<158> 자가인산화된 피토크롬의 PAPP5에 의한 탈인산화

<159> 가역적인 인산화/탈인산화 반응이 신호전달 및/또는 피토크롬 활성 조절과 관계있을 수 있음이 생화학적 분석을 통해 이전에 보고된 바 있다(Yeh, K. C. & Lagarias, J. C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95:13976-13981, 1998; Fankhauser, C. *et al.*, *Science*, 284:1539-1541, 1999). 따라서, 본 발명자들은 피토크롬과 상호 결합 작용하는 PAPP5의 분자적 성질을 확인하기 위하여 자가인산화된 피토크롬 A가 시험관 내에서 PAPP5에 의하여 직접적으로 탈인산화되는지 조사하였다.

<160> 먼저, 정제된 귀리 피토크롬 A(금호생명환경과학연구소에서 제공받음) 1 μ g을 포함하는 KP 완충용액(20mM Tris-HCl pH7.5, 30mM MgCl₂, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 0.1%

β -mercaptoethanol, 0.1% ethanol)을 얼음 위에 놓고 664nm에서 $50 \mu\text{mol S}^{-1} \text{m}^{-2}$ 의 광도를 가지는 R_c 를 5분 동안 조사시켰다. 이후, 상기 반응용액에 [γ - ^{32}P]ATP를 첨가하여 30분 동안 암 조건에서 반응시켰다(피토크롬 A의 자가인산화반응). 그리고 나서, 상기 실시에 <4-1> 및 <5-1>에서 각각 제조한 융합 단백질 GST-PAPP5, GST-TPR 및 GST-PP2Ac $1\mu\text{g}$ 을 각각 첨가하여 30분 더 반응시켰다. 희미한 녹색 안전등(dim green safe light) 하에서 $12\mu\text{l}$ 의 $5\times$ 트리스-글리신 SDS 시료 완충용액($5\times$ Tris-Glycine SDS sample buffer)을 첨가하여 반응을 종결시켰다. 10% SDS-PAGE를 수행한 후, 후지 FLA-2000R 이미지 분석기(Fuji Photo Film)를 이용하여 자기방사기록 분석(autoradiography analysis)을 수행하였다.

<161> 그 결과, 도 11A에서 보는 바와 같이, GST-PAPP5만이 자가인산화된 귀리 피토크롬 A의 Pfr형을 약 80% 정도로 탈인산화시킴을 확인하였다. GST-PP2Ac를 포함하는 반응 혼합액에서도 귀리 피토크롬 A의 탈인산화가 검출되기는 하였으나, 그 활성이 매우 낮았다. 이로부터 PAPP5가 자가인산화된 Pfr-피토크롬을 주 타겟으로 하여 탈인산화시키고, 이를 통하여 Pfr-피토크롬의 인산화 상태를 조절하는 것으로 사료된다. 즉, 상기 결과는 자가인산화된 Pfr형의 피토크롬 A가 PAPP5의 탈인산화 효소 활성을 유도하고, 활성화된 PAPP5는 다시 자가인산화된 Pfr-피토크롬 A를 직접적으로 탈인산화시킨다는 것을 나타낸다. 또한 상기 결과는 PAPP5의 TPR 도메인(GST-TPR) 또는 PAPP5의 효소 활성 도메인(GST-PP2Ac)에 의한 단순한 물리적 결합 또는 비특이적 효소 활성이 Pfr-피토크롬의 인산화 상태에 영향을 미치지 못함을

나타낸다.

<162> 이후, 본 발명자들은 PAPP5의 탈인산화효소 활성이 피토크롬 분자의 고유 특성인 분광학적 구조 변화($Pr \leftrightarrow Pfr$)에 의존하는지를 조사하였다. 피토크롬을 함유하는 KP 완충용액을 얼음 위에 놓고 664nm에서 $50 \mu\text{mol S}^{-1} \text{m}^{-2}$ 의 광도를 가지는 R_c (피토크롬이 Pfr 형으로 전환됨) 또는 748nm에서 $50 \mu\text{mol S}^{-1} \text{m}^{-2}$ 의 광도를 가지는 FR_c (피토크롬이 Pfr 형으로 전환됨)를 5분 동안 각각 조사시켰다. 이후, 상기와 동일한 방법으로 피토크롬의 자가인산화/탈인산화 실험을 수행하였다.

<163> 그 결과, 도 11B에서 보는 바와 같이, Pr 형보다는 Pfr 형에서 PAPP5에 의한 탈인산화 정도가 현저히 높음을 확인할 수 있었다.

<164> 상기 결과들은 피토크롬에 대한 PAPP5의 탈인산화효소 활성이 빛에 의해 조절되고, 특히 주로 인산화된 Pfr -형에서 효율적으로 나타낸다는 것을 시사한다. 이러한 피토크롬-PAPP5 복합체 형성과 탈인산화효소 활성의 활성화/유도(activation/stimulation)간의 상호 관계는 PAPP5가 피드백 방식으로 피토크롬의 인산화된 Pfr 형을 특이적 표적(specific target)으로 한다는 것을 제시한다.

<실시예 11>

<166> PAPP5의 TPR 도메인의 과발현 식물체 제조

PAPP5의 TPR 도메인의 기능을 조사하기 위하여 우성 음성 돌연변이(dominant negative mutation)를 통한 역 유전적 접근(reverse genetic approach)을 이용하였다. TPR 도메인 코딩 부위(서열번호 4의 1-138 아미노산 서열)를 증폭하기 위하여 서열번호 5 및 서열번호 10으로 기재되는 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. 이 때 PCR 반응은 94°C에서 5분 동안 주형 DNA를 전 변성시킨 후, 94°C에서 30초; 50°C에서 30초; 및 72°C에서 1분간의 조건을 한 사이클로 하여 총 30회 반복 수행한 다음, 72°C에서 10분 동안 반응시키는 조건으로 수행하였다. 이후, PCR 산물을 pNB96 벡터에 클로닝하였다(**도 12A** 참조). 제조된 벡터를 ‘pNB96-TPR’이라 명명하였다. pNB96-TPR 벡터를 전기충격법으로 아그로박테리움 AGL1에 도입하였다. 이후, 화기 수침 방법(SIGNAL T-DNA Express (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>), Salk Institute Genomic Analysis Laboratory)에 따라 형질전환된 아그로박테리움으로 애기장대를 형질전환시켰다. 25 μ g/ μ l의 DL-PPT(Duchefa Biochemie BV)를 이용하여 형질전환 식물을 선발하였다. 총 25개체의 T1 라인을 얻었으며, 이들을 ‘PAPP5-DN’이라 명명하였다. 이후, DL-PPT 저항성의 분리를 토대로 하여 상동형 T3 종자들을 분리하였다. T3 식물체들을 백색광 하에서 배양한 결과, 상기 식물체들은 야생형에 비해 짧은 신장, 다수의 신초(multiple shoots) 및 꽃 신초 절간의 왜성화(dwarfing of the floral shoot internodes)를 나타내었다(**도 12B** 참조). 이는 PAPP5의 TPR 도메인이 단백질-단백질 상호작용에 관여하는 것으로 보아, 향상된 단백질-단백질 상호 작용 능에 의해 유도되어 지는 것으로 판단된다. 또한, PAPP5의 TPR 도메인을 식물체에

도입하여 과발현시키면 식물체에 왜성을 도입할 수 있음을 나타낸다.

【발명의 효과】

<168> 이상 살펴본 바와 같이, 본 발명에서는 식물의 생장 및 발달을 조절하는 광 신호 전달에 관여하는 신규 단백질 및 그의 기능을 규명하였다. 본 발명에 따른 PAPP5는 피토크롬 A 및 B와 교차 상호 결합 작용한다. 본 발명에 따른 PAPP5는 피토크롬과의 상호작용에 관여하는 TPR 도메인과 탈인산화효소 활성을 담당하는 PP2A 촉매 도메인을 포함한다. 본 발명에 따른 PAPP5는 탈인산화효소로서 이용될 수 있으며, 광 신호전달에 민감한 식물체의 제조에 유용하게 이용될 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 PAPP5 내 존재하는 TPR 도메인은 왜성 식물체의 제조에 유용하게 이용될 수 있다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

(a) 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열; 또는
(b) 상기 아미노산 서열과 적어도 70% 이상의 상동성을 갖는 아미노산 서열
을 포함하는 분리된 폴리펩티드.

【청구항 2】

제1항에 있어서, 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드.

【청구항 3】

제1항에 있어서, 서열번호 4의 1-138의 아미노산 서열이 결실된 폴리펩티드.

【청구항 4】

(a) 제1항의 폴리펩티드를 암호화하는 염기서열; 또는
(b) 상기 염기서열과 상보적인 염기서열을 갖는 분리된 폴리뉴클레오티드.

【청구항 5】

제4항에 있어서, 서열번호 3으로 표시되는 염기서열을 갖는 폴리뉴클레오티

드.

【청구항 6】

제4항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터.

【청구항 7】

제6항에 있어서, 서열번호 3으로 표시되는 염기서열을 갖는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터.

【청구항 8】

제6항의 재조합 벡터를 포함하는 세포.

【청구항 9】

하기의 단계를 포함하는 광 신호 전달에 민감한 식물체를 제조하는 방법:

- (a) 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 발현 벡터에 삽입하는 단계; 및
- (b) 상기 발현 벡터를 식물체 내로 도입하는 단계.

【청구항 10】

제9항의 방법에 의해 제조된 형질전환 식물체.

【청구항 11】

제10항의 형질전환 식물체로부터 유래된 식물조직 또는 종자.

【청구항 12】

하기의 단계를 포함하는 왜성 식물체(dwarf plant)를 제조하는 방법:

- (a) 서열번호 4의 1-138의 아미노산 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 발현 벡터에 삽입하는 단계; 및
- (b) 상기 발현 벡터를 식물체 내로 도입하는 단계.

【청구항 13】

제12항에 있어서, 상기 식물체는 야생형 식물체에 비하여 짧은 신장(shorter height), 다수의 신초(multiple shoots) 및 꽃 신초 절간(floral shoot internodes)으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 표현형(phenotypic trait)을 나타내는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 14】

제12항의 방법에 의해 제조된 형질전환 식물체.

【청구항 15】

제14항의 형질전환 식물체로부터 유래된 식물조직 또는 종자.

【청구항 16】

제10항 또는 제14항에 있어서, 상기 식물체는 쌍자엽 식물 또는 단자엽 식물인 것을 특징으로 식물체.

【청구항 17】

제1항의 폴리펩티드, 이를 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 이들의 절편 또는 유도체를 이용하여 페토크롬 신호 전달 관련 물질을 탐색하는 방법.

【청구항 18】

서열번호 4의 1-138의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드 또는 이를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 이용하여 식물의 왜소증(dwarfism) 유발 물질을 탐색하는 방법.

【청구항 19】

제17항 또는 제18항에 있어서, cDNA 라이브러리 스크리닝, BAC(bacterial artificial chromosome) 스트리닝, DNA 칩, 단백질 칩, 중합효소 연쇄반응(PCR), 노던 블럿, 서던 블럿, 웨스턴 블럿, 효소 면역 반응(ELISA), 2-D 겔 분석, 효모 2-하이브리드 시스템(yeast two-hybrid system) 및 시험관 내 결합 어세이(*in vitro* binding assay)를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

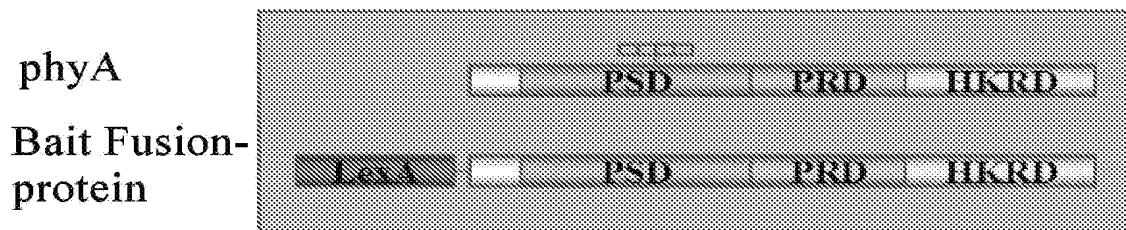
【청구항 20】

하기의 단계를 포함하는 인산화효소활성을 갖는 단백질을 생산하는 방법:

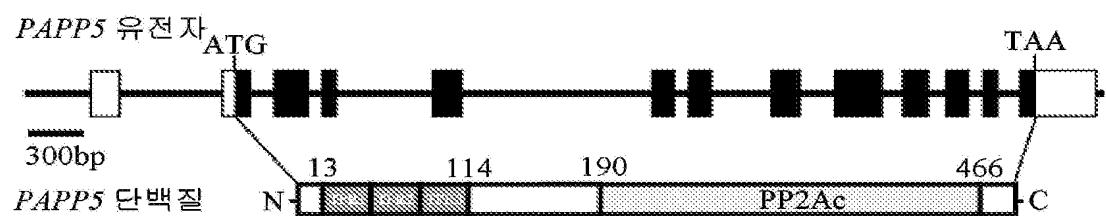
- (a) 제1항 내지 제3항 중에서 선택된 어느 한 항의 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 발현 벡터에 도입하는 단계;
- (b) 상기 발현 벡터를 세포에 도입하는 단계;
- (c) 상기 세포를 배양하여 상기 폴리뉴클레오티드를 발현시키는 단계; 및
- (d) 세포 배양액으로부터 발현된 단백질을 회수하는 단계.

【도면】

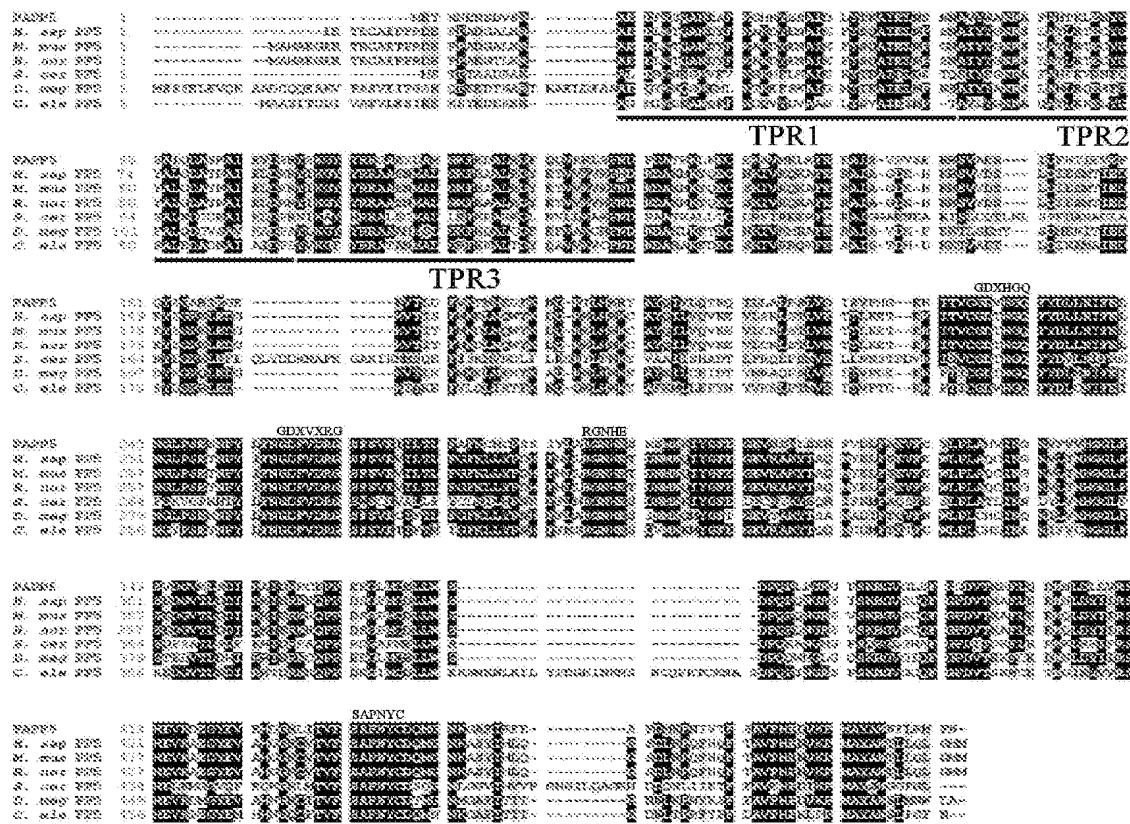
【도 1】



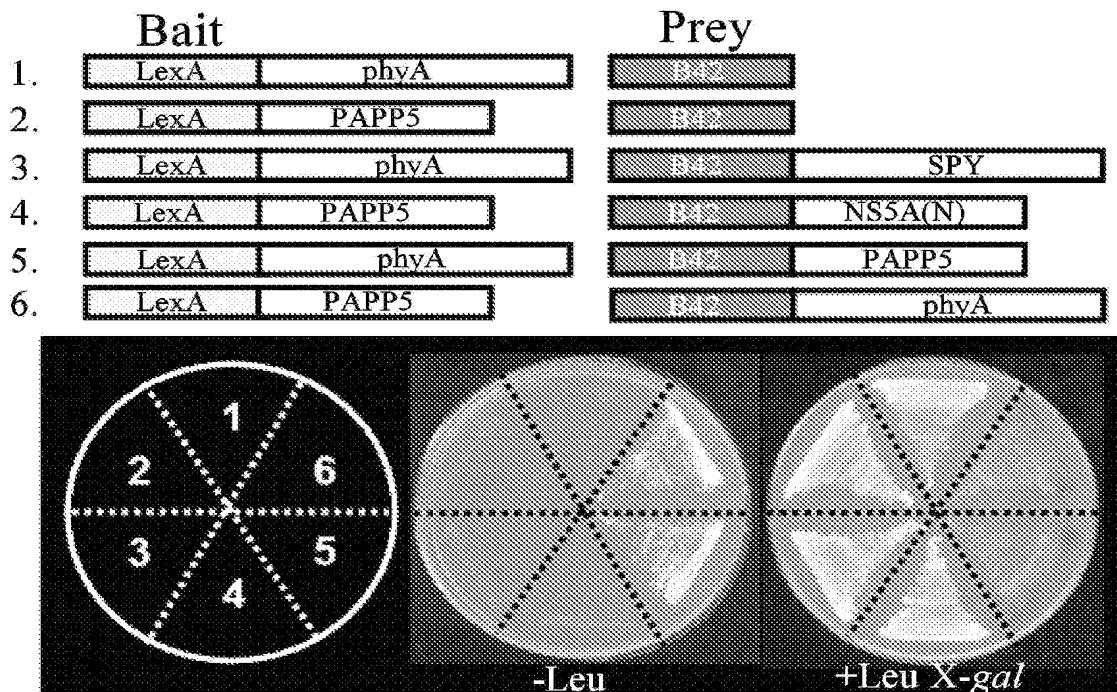
【도 2】



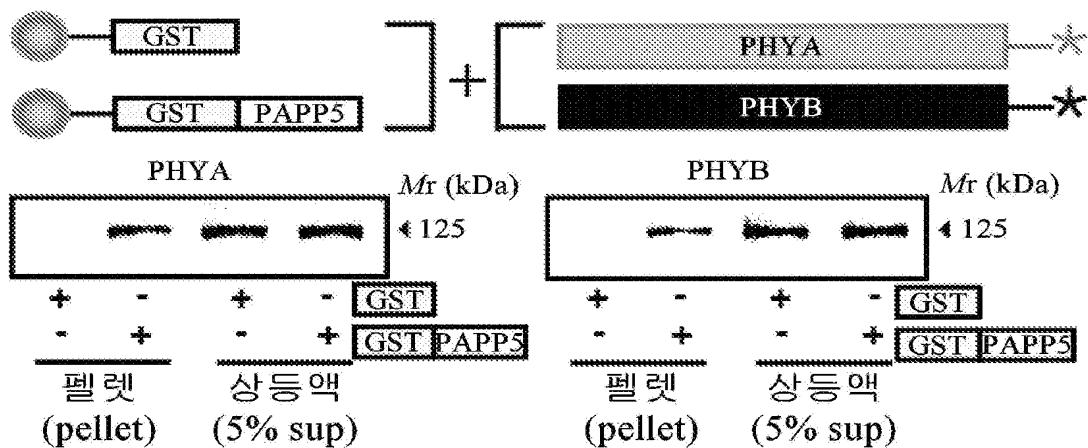
【도 3】



【도 4】

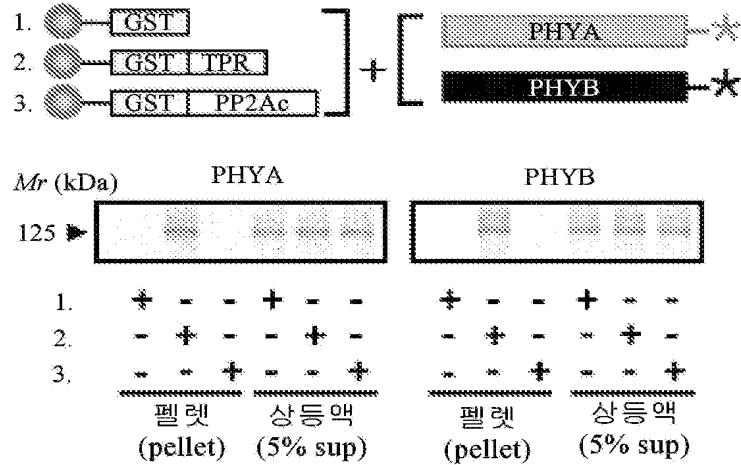


【도 5】

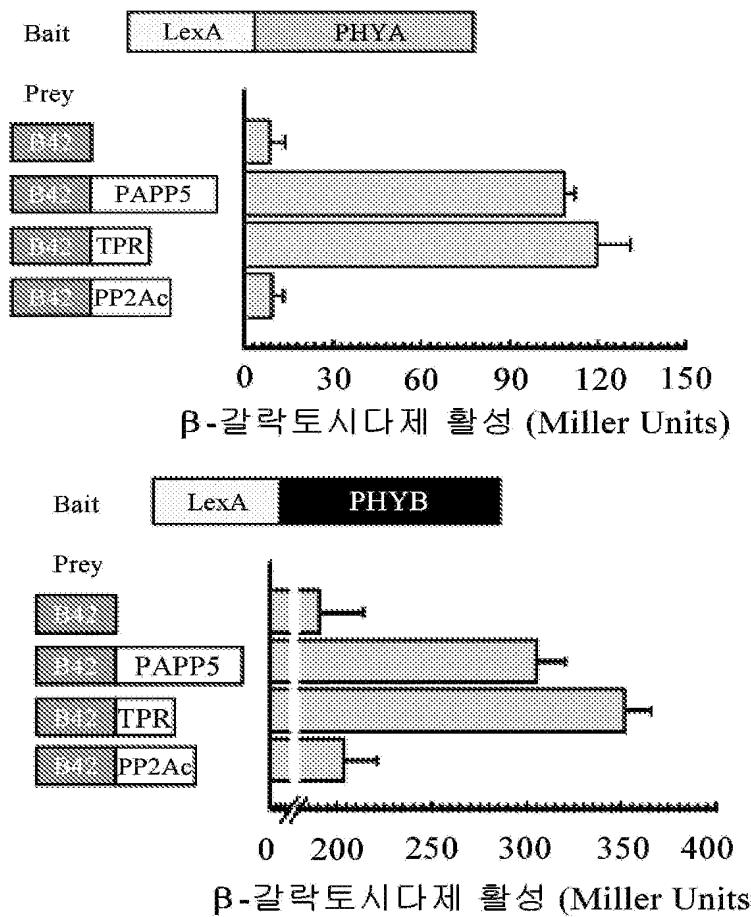


【도 6】

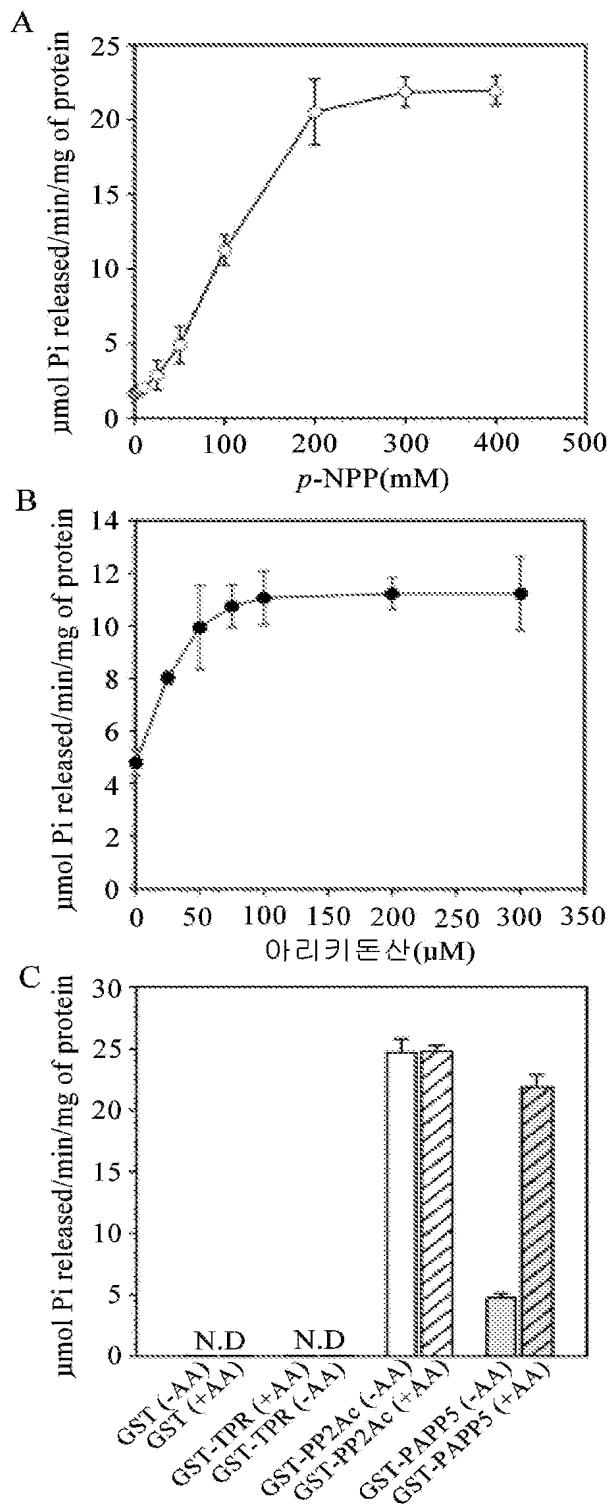
A



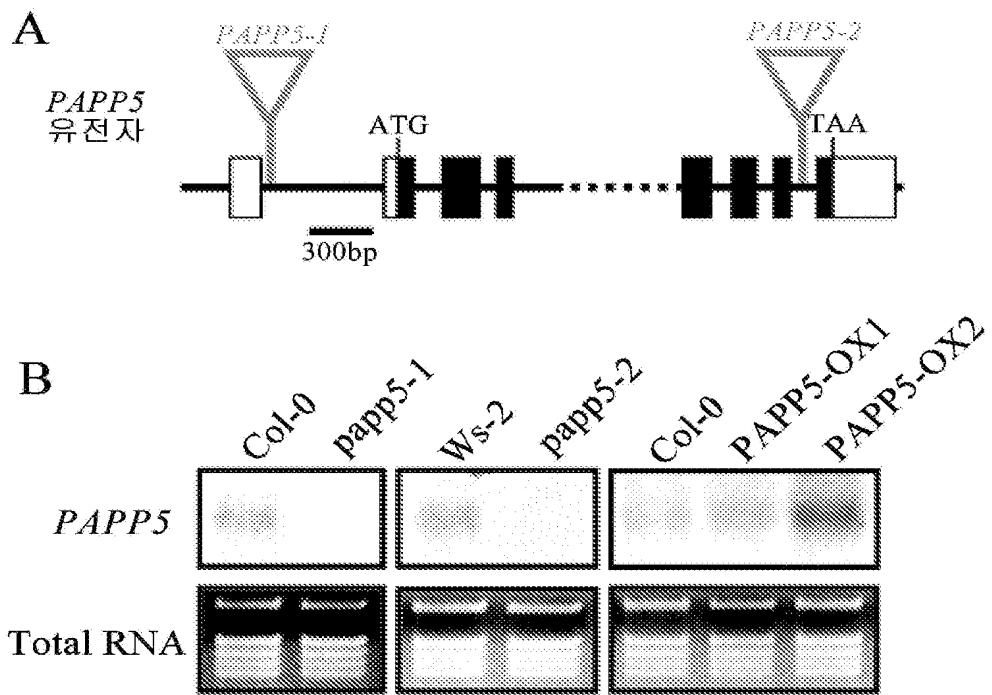
B



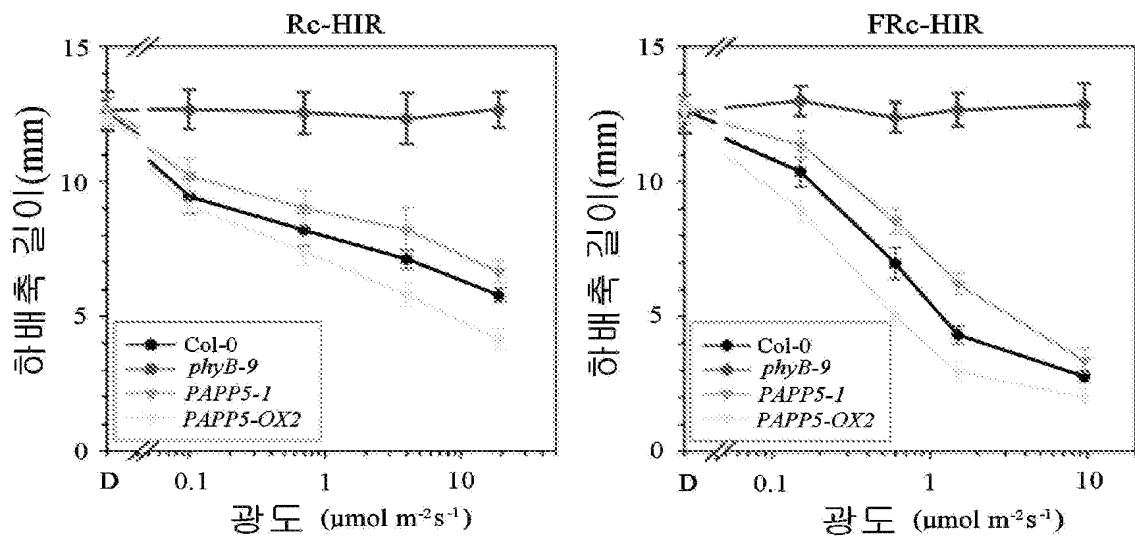
【Figure 7】



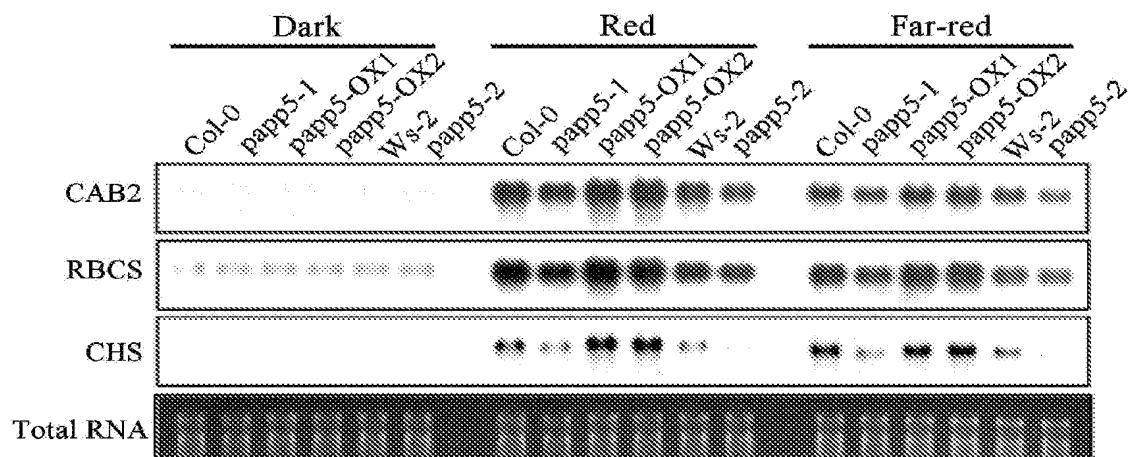
【도 8】



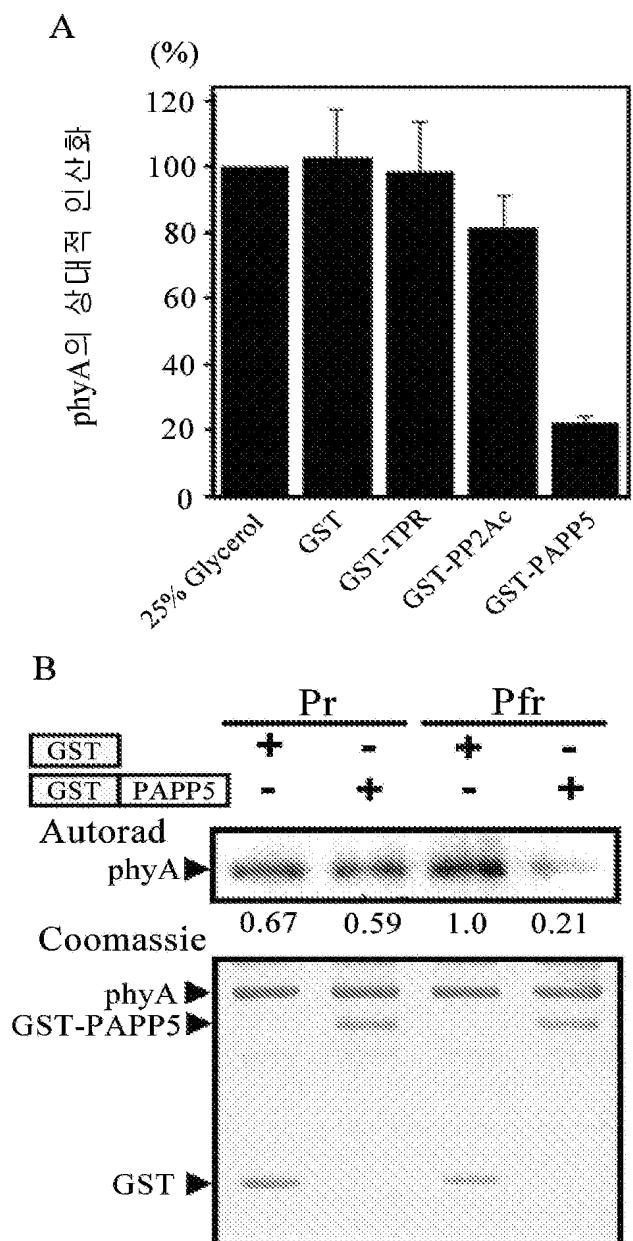
【도 9】



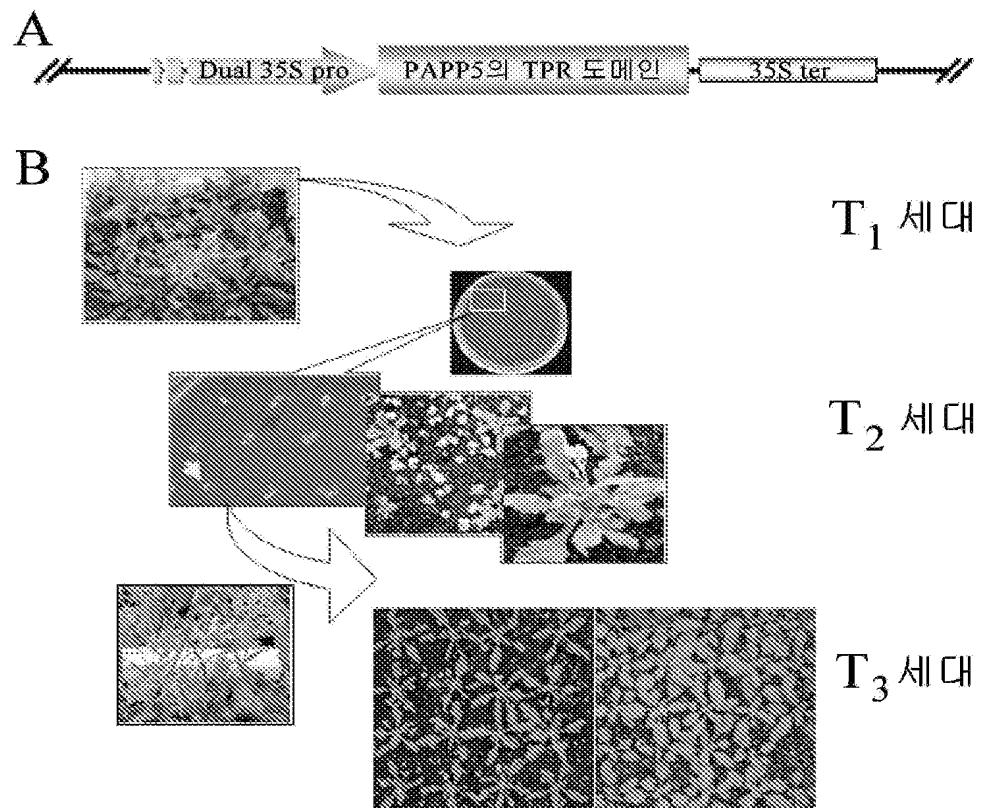
【도 10】



【도 11】



【도 12】



【서열목록】

서열목록 전자파일 첨부(C:\KIPONET\KEDITOR\OldData\서열목록\NP03-0089.app)

<110> Genomine, Inc.
POSTECH FOUNDATION

<120> Novel phytochrome-interacting protein and a use thereof

<130> NP03-0089

<160> 13

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 1

ggatccaaat gtcaggctct aggccgact 29

<210> 2

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 2

ctcgagctac ttgtttgctg cagcgagttc 30

<210> 3
<211> 1455
<212> DNA
<213> Arabidopsis thaliana

<400> 3
atggagacca agaatgagaa ttctgatgtt tcacggcag aggagttaa aagtcaggcc 60
aacgaagctt ttaaaggctca caaatactcc agtgctattg atctatatac aaaagctatt 120
gaactcaaca gcaacaacgc tgtgtattgg gcaaatcgtg cattgctca cacaactg 180
gaggaatatg gcagtgcaat acaggatgca tcgaaggcca ttgaagttga ttcaagatac 240
tctaaggctt attacaggcg tggtgctgct tatcttgcca tggaaaatt taaggatgcc 300
ttgaaggact tccaacaggt aaaaaggctt ttcctaatg accctgatgc cacaagaaag 360
ctaaaggaat gtgagaaagc agtgatgaaa ctcaaattt aagaagcaat ctctgtgcca 420
gtatctgaaa ggcgttcagt agctgagtcc attgacttcc atacaataga ggttggcc 480
caatattctg gtgctagaat tgagggagag gaagttacct tagatttgc gaaaacgtatg 540
atggaggatt ttaagaacca aaaaacattt cataaacggt atgcctatca aatcgcttta 600
cagacttaggc aaatcttgc tgcactgcct tctcttgc ttataaagtgt tccacatggc 660
aaacatcatca ctgtttgcgg tgacgttcat ggtcagttct acgttcttca aatatcttt 720
gagcttaatg gcctcccttc ggaggagaac ccataacctat ttaatggcga ctttgcggac 780
agaggctcat tctccgttga gatcatcctc actttgttgc cttcaagtttgcatgtgc 840
tcatccatcat atcttagccag agggaaaccat gaaagcaaga gcatgaacaa aatttatggt 900

tttgggggg aggttcggc caaggtagt gaaaaattcg tggatcttt tgctgaagg	960
ttctgttacc tcccggttgc tcatgttata aatgggaagg tcttcgtggt acatggaggt	1020
ctttcagtg ttgacggcgt gaaactctca gacatcagag ccattgacag attctgttag	1080
ccaccagagg aaggactaat gtgtgaacta ttgtggagtg atcctcaacc tctccctgga	1140
agaggcccaa gcaagcgagg agttggtcta tcattggtg gagatgtgac aaagaggttt	1200
ttgcaagata acaatttaga ttgttggtc cggtcacatg aagtaaaaga tgaaggttat	1260
gaggttgaac atgacggtaa actcataact gtttctctg cgccaaatta ctgtgatcag	1320
atgggttaata agggagccctt cattcggttt gaagctcctg atatgaagcc aaacattgtt	1380
acattctcag cagtgcctca tccggatgtg aagcctatgg catatgcaaa caactttctc	1440
aggatgttca actaa	1455

<210>	4
<211>	484
<212>	PRT
<213>	Arabidopsis thaliana

<400> 4
Met Glu Thr Lys Asn Glu Asn Ser Asp Val Ser Arg Ala Glu Glu Phe
1 5 10 15

Lys Ser Gln Ala Asn Glu Ala Phe Lys Gly His Lys Tyr Ser Ser Ala
20 25 30

Ile Asp Leu Tyr Thr Lys Ala Ile Glu Leu Asn Ser Asn Asn Ala Val
35 40 45

Tyr Trp Ala Asn Arg Ala Phe Ala His Thr Lys Leu Glu Glu Tyr Gly
50 55 60

Ser Ala Ile Gln Asp Ala Ser Lys Ala Ile Glu Val Asp Ser Arg Tyr
65 70 75 80

Ser Lys Gly Tyr Tyr Arg Arg Gly Ala Ala Tyr Leu Ala Met Gly Lys
85 90 95

Phe Lys Asp Ala Leu Lys Asp Phe Gln Gln Val Lys Arg Leu Ser Pro
100 105 110

Asn Asp Pro Asp Ala Thr Arg Lys Leu Lys Glu Cys Glu Lys Ala Val
115 120 125

Met Lys Leu Lys Phe Glu Glu Ala Ile Ser Val Pro Val Ser Glu Arg
130 135 140

Arg Ser Val Ala Glu Ser Ile Asp Phe His Thr Ile Glu Val Glu Pro
145 150 155 160

Gln Tyr Ser Gly Ala Arg Ile Glu Gly Glu Glu Val Thr Leu Asp Phe
165 170 175

Val Lys Thr Met Met Glu Asp Phe Lys Asn Gln Lys Thr Leu His Lys
180 185 190

Arg Tyr Ala Tyr Gln Ile Val Leu Gln Thr Arg Gln Ile Leu Leu Ala
195 200 205

Leu Pro Ser Leu Val Asp Ile Ser Val Pro His Gly Lys His Ile Thr
210 215 220

Val Cys Gly Asp Val His Gly Gln Phe Tyr Asp Leu Leu Asn Ile Phe
225 230 235 240

Glu Leu Asn Gly Leu Pro Ser Glu Glu Asn Pro Tyr Leu Phe Asn Gly
245 250 255

Asp Phe Val Asp Arg Gly Ser Phe Ser Val Glu Ile Ile Leu Thr Leu
260 265 270

Phe Ala Phe Lys Cys Met Cys Pro Ser Ser Ile Tyr Leu Ala Arg Gly
275 280 285

Asn His Glu Ser Lys Ser Met Asn Lys Ile Tyr Gly Phe Glu Gly Glu
290 295 300

Val Arg Ser Lys Leu Ser Glu Lys Phe Val Asp Leu Phe Ala Glu Val
305 310 315 320

Phe Cys Tyr Leu Pro Leu Ala His Val Ile Asn Gly Val Phe Val
325 330 335

Val His Gly Gly Leu Phe Ser Val Asp Gly Val Lys Leu Ser Asp Ile
340 345 350

Arg Ala Ile Asp Arg Phe Cys Glu Pro Pro Glu Gly Leu Met Cys
355 360 365

Glu Leu Leu Trp Ser Asp Pro Gln Pro Leu Pro Gly Arg Gly Pro Ser
370 375 380

Lys Arg Gly Val Gly Leu Ser Phe Gly Gly Asp Val Thr Lys Arg Phe
385 390 395 400

Leu Gln Asp Asn Asn Leu Asp Leu Leu Val Arg Ser His Glu Val Lys
405 410 415

Asp Glu Gly Tyr Glu Val Glu His Asp Gly Lys Leu Ile Thr Val Phe
420 425 430

Ser Ala Pro Asn Tyr Cys Asp Gln Met Gly Asn Lys Gly Ala Phe Ile
435 440 445

Arg Phe Glu Ala Pro Asp Met Lys Pro Asn Ile Val Thr Phe Ser Ala
450 455 460

Val Pro His Pro Asp Val Lys Pro Met Ala Tyr Ala Asn Asn Phe Leu
465 470 475 480

Arg Met Phe Asn

<210> 5

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 5

ggatccatgg agaccaagaa tgag 24

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 6
ctcgagttag ttgaacatcc tgag 24

<210> 7
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR primer

<400> 7
ggatccgatg tcaggctcta ggccgact 28

<210> 8
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR primer

<400> 8
gctgatcagc atggttccg gagtcgggg tagt 34

<210> 9
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 9

cccgccgga ctaatatggc atcatcagca tcat 34

<210> 10

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 10

ctcgagtcaa gagattgctt cttcaaa 27

<210> 11

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 11

ggatccatgc cagtatctga aaggcgt 27

<210> 12

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 12

atggagacca agaatgagaa ttct

24

<210> 13

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 13

ttagttgaac atcctgagaa agtt

24